

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada



**DIGESTIBILIDAD, ALERGENICIDAD *IN VITRO*
Y EFECTO INMUNOMODULADOR DE
PROTEÍNAS DE HUEVO PROCESADO**



RODRIGO JIMÉNEZ SAIZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN (CSIC-UAM)

Madrid

2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada

**DIGESTIBILIDAD, ALERGENICIDAD *IN VITRO*
Y EFECTO INMUNOMODULADOR DE
PROTEÍNAS DE HUEVO PROCESADO**

Memoria presentada por:

Rodrigo Jiménez Saiz

Para optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS**



Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Elena Molina Hernández

Dra. Rosina López-Alonso Fandiño

ELENA MOLINA HERNÁNDEZ, CIENTÍFICA TITULAR DEL CSIC Y ROSINA LÓPEZ-ALONSO FANDIÑO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC, EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

INFORMAN:

Que el presente trabajo titulado “Digestibilidad, alergenicidad *in vitro* y efecto inmunomodulador de proteínas de huevo procesado” y que constituye la Memoria que presenta Rodrigo Jiménez Saiz para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM).

Y para que conste firmamos el presente informe a 13 de febrero de 2012.

Fdo.: Elena Molina Hernández

Fdo.: Rosina López-Alonso Fandiño

Agradecimientos

Para terminar, quiero dar las gracias a todos aquellos que crean que han de ser condecorados aquí, no sin antes hacer mención especial de las personas que más han contribuido al desarrollo de este trabajo.

Mis directoras de tesis, Elena y Rosina, con las que estaré en deuda eternamente, por haber moldeado con tanto esmero la abrupta materia bruta que hoy es bisoño y naciente doctor; por la imborrable huella que en mi formación han dejado.

Prof Mine, thank you for passing on to me your unique and passionate way of understanding science as well as for your unlimited availability through the journey.

Lourdes, directora del extinto IFI (CSIC) y Vivi, del CIAL (CSIC-UAM), centros donde se ha desarrollado la mayoría de la tesis. Mercedes, por su buen hacer al frente de mi grupo de investigación y Elena Alonso, del Hospital Materno Infantil La Paz, por su colaboración. Doy gracias a la mano que me da de comer, la del ministerio de algo que tan poco parece importar en este país, por permitirme disfrutar de una beca FPU, mas no torne en libelo ésta página.

No me olvido de mis compañeros, por facilitarme el devenir diario y hacer esta senda habitable. Tengo muy presente a mi familia, sobre todo a mis padres y a mi hermana, por ser lo mejor que me ha pasado, por aguantarme todos estos años. También a mis amigos, siempre en mi sentir aunque a veces no lo parezca.

A Dios, por sus inescrutables caminos; y a mis dioses paganos (Camus, Hesse, Unamuno, Pessoa, Levi, Voltaire, Bowie, Baudelaire, Millás, Sabina, Baroja, Nacho Vegas, Galdós, McCullers, Cohen, el Brujo, Sabato, Kafka, Reverte, el Cid, Platón, Abraham Boba y tantos más...), por el día a día.

Por último, al amor, que maltraté en los bazares de la noche y recuperé en Canadá...

Amada Ciencia

En este absurdo mundo tú me amparas,
acertijo infinito, verdad prima,
alma máter, excelsa musa opima,
fanal de saber, prisma de mil caras.

Haces livianos los días, en aras
de un mundo mejor, con tu eterna rima,
apacible son de libros y enzimas,
más las tribulaciones que deparas.

Así se me va la vida, en ti habito,
con mi hábito que antes fue hartó blanco
mas hoy se muestra gris, tan desgastado...

Sigo creyendo que el gris es bonito,
Y tú sigues sentada aquí en mi flanco,
¿habré vivido o tan solo ensuciado?

Rodrigo Jiménez Saiz

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Alergia a huevo	11
1.1 Diagnóstico y prevalencia	11
1.2 Mecanismos inmunológicos	12
1.2.1 Mucosa intestinal: transporte y sensibilización	12
1.2.2 El balance Th1/Th2 y las células T-reguladoras	14
1.3 Alérgenos de huevo	16
1.3.1 Ovoalbúmina	17
1.3.2 Ovomucoide	18
1.3.3 Lisozima	18
2. Efecto del procesado en alérgenos alimentarios	19
2.1 Tratamiento térmico	20
2.2 Almacenamiento	22
3. Efecto de la matriz	23
3.1 Interacción con carbohidratos	24
3.1.1 Reacción de Maillard	24
3.1.2 Influencia de la reacción de Maillard en la alergenidad	26
3.1.3 Otras interacciones: polisacáridos de interés alimentario	27
3.1.4 Mezclas polisacárido-proteína: influencia en la alergenidad	31
3.2 Interacción con lípidos: emulsiones	32
3.2.1 Efecto de la interacción con lípidos en la alergenidad	33
4. Aplicación del procesado en el desarrollo de fórmulas terapéuticas	35
4.1 Aproximaciones terapéuticas: inmunoterapia oral	35
4.2 Inmunoterapia oral para alérgicos a huevo	37
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	39

RESULTADOS	47
DISCUSIÓN GENERAL	51
1. Digestión de la lisozima	53
2. Efecto del procesado sobre alérgenos de huevo	56
2.1 Ovoalbúmina	56
2.2 Ovomucoide	59
3. Efecto de la matriz sobre alérgenos de huevo	60
3.1 Interacción con glucosa por reacción de Maillard	60
3.2 Interacciones no covalentes con polisacáridos	63
3.3 Interacción con lípidos	65
4. Efecto inmunomodulador de fórmulas de huevo procesado	66
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	75

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

a_w: actividad de agua

DSC: calorimetría diferencial de barrido

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

G: goma arábica

IFN- γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

iT-regs: células T-reguladoras adaptativas

IL: interleucina

LYS: lisozima

ME: metil esterificación

nT-regs: células T-reguladoras naturales

OIT: inmunoterapia oral

OM: ovomucoide

OT: ovotransferrina

OVA: ovoalbúmina

O/W: emulsión de aceite en agua

P: pectina

PC: fosfatidilcolina

pI: punto isoeléctrico

RM: reacción de Maillard

RP-HPLC: cromatografía de alta eficacia en fase inversa

SDS-PAGE: electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico

SEC: cromatografía de exclusión molecular

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

Th: linfocitos T de ayuda

Th-0: linfocitos T de ayuda vírgenes

Th-1: linfocitos T de ayuda de respuesta no alérgica

Th-2: linfocitos T de ayuda de respuesta alérgica

W/O: emulsión de agua en aceite

X: xilano

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1. Alergia a huevo

La relevancia del huevo, tanto en el ámbito nutricional como tecnológico, es indiscutible, dado que supone una excelente fuente de proteínas de alto valor biológico y presenta propiedades funcionales de gran utilidad para la industria alimentaria (Mine, 2002). La producción en España de 986 millones de docenas de huevos en el año 2008, según los datos ofrecidos por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM, 2009), refrenda su importancia. A pesar de tales ventajas, el huevo pertenece al grupo de “*los ocho*”, que abarca aquellos alimentos mayormente implicados en alergias alimentarias incluyendo leche, cacahuete, frutos secos, trigo, pescado, marisco y soja (Bush y Hefle, 1996).

La alergia a huevo está clasificada como una reacción no tóxica de hipersensibilidad en la que está implicada el sistema inmune. Se trata de una respuesta inmune exacerbada y manifiesta frente a alérgenos de huevo—entendiéndose por antígenos las moléculas capaces de ser reconocidas por el sistema inmune y como alérgenos los antígenos capaces de desencadenar una respuesta alérgica—que de cualquier otro modo serían inocuos (Bischoff y Crowe, 2005; Holgate y Polosa, 2008). La alergia a huevo está mediada por anticuerpos denominados inmunoglobulina (Ig) E, lo que la ubica dentro de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, siendo esta la forma de alergia a alimentos más común y mejor caracterizada (Ebo y Stevens, 2001; Caubet y Wang, 2011).

1.1 Diagnóstico y prevalencia

La diagnosis de alergia a huevo es normalmente determinada por pruebas de reacción cutánea y ensayos de radioalergoabsorbencia—que miden niveles de IgE específicos en sangre—, sin embargo, la provocación oral doble ciego, controlada con placebo, es el patrón oro, ya que confirma el diagnóstico clínico. Dado que la provocación oral con huevo puede dar pie a reacciones adversas, se han establecido valores de corte para los niveles específicos de IgE determinados por ensayos de radioalergosorbencia, y para el diámetro de pápula medido en pruebas de reacción cutánea, pudiendo así identificar pacientes alérgicos a huevo sin necesidad de poner al afectado en una posible situación de riesgo (Heine y col., 2006). En los primeros estudios realizados con este fin, se concluyó que un nivel de IgE específica de huevo >6kU/L se correlacionaba con un valor predictivo positivo >95% en niños y adolescentes (Sampson y Ho, 1997). En estudios clínicos más

recientes, realizados en grupos de niños alemanes (Celik-Bilgili y col., 2005) y japoneses (Komata y col., 2007), se observó que estableciendo 12.6 y 25.5 kU/L respectivamente, como nivel de corte, se daba un 95% de valor predictivo positivo, mientras que otro estudio similar, efectuado en niños españoles menores de dos años, apuntó un nivel de corte bastante menor, situado en >0.36 kU/L, con un valor predictivo del 94% (Boyano Martínez y col., 2001). Respecto a pruebas de reacción cutánea, tampoco hay un consenso sobre qué diámetro de pápula fijar como valor predictivo positivo de alergia a huevo (Sporik y col., 2000; Verstege y col., 2005), aunque un diámetro de pápula ≥ 3 mm se ha interpretado habitualmente como síntoma de alergia (Caubet y Wang, 2011).

La prevalencia estimada de alergia a huevo está comprendida entre 1.6 y 3.2% (Heine y col., 2006) lo que la sitúa, conforme a diversos estudios desarrollados en países de Europa (Gustafsson y col., 2003; Kristinsdottir y col., 2011), Asia (Chiang y col., 2007; Chen y col., 2011) y Oceanía (Osborne y col., 2011), como la mayor reacción de hipersensibilidad en la población pediátrica junto con la leche (en Europa y Asia), o con el cacahuete (en Oceanía). Las variaciones entre estudios son atribuidas a diferentes factores, como los parámetros elegidos para decidir si el individuo en cuestión es o no alérgico, las características clínicas de las cohortes estudiadas (edad, origen) y las características del alérgeno usado durante la provocación (naturaleza, procesado). Tales diferencias se ven reflejadas en la gran heterogeneidad de resultados publicados sobre la prevalencia de alergia a huevo (Rona y col., 2007). Además, la ingesta de huevo puede causar anafilaxis en pacientes altamente sensibilizados (Colver y col., 2005; Ross y col., 2008), induciendo reacciones severas que pueden llegar a ocasionar la muerte (Mehl y col., 2005).

1.2 Mecanismos inmunológicos

1.2.1 Mucosa intestinal: transporte y sensibilización

Las reacciones de hipersensibilidad a alimentos mediadas por IgE pueden ocurrir después de la exposición al antígeno por diferentes rutas entre las que destacan la vía gastrointestinal, la vía respiratoria y la vía cutánea (Chapman y col., 2006); estando la presente tesis doctoral enmarcada en la sensibilización a huevo a través del sistema digestivo. Durante muchos años se presumió que las macromoléculas no eran capaces de llegar al torrente sanguíneo por el tracto gastrointestinal, apoyándose en la idea de que la presencia de secreciones mucosas, IgA y bacterias comensales se comportaban en el intestino a modo de barrera. Aun así, en la actualidad es sabido que los antígenos dietarios pueden pasar a través del epitelio intestinal tanto en su forma nativa como parcialmente

digeridos y, por tanto, interactuar directamente con las células del sistema inmune (Chehade y Mayer, 2005). También se sabe que la absorción de antígenos alimentarios es más significativa en niños que en adultos, con un descenso de las titulaciones de anticuerpos específicos de alimentos a partir del primer año de vida (Burks y Sampson, 1993), lo que puede ser debido a la maduración del epitelio intestinal (Vukavić, 1984).

Los antígenos alimentarios pueden atravesar el intestino y entrar en contacto con el sistema inmune mediante múltiples mecanismos, que se hallan representados en la **Figura 1**, entre los cuales está el transporte del antígeno alimentario a través de las uniones celulares del epitelio intestinal (Fig. 1, A); la invaginación, proceso más conocido por endocitosis (Fig.1, B); la absorción mediada por células especializadas, llamadas células M, las cuales están estratégicamente localizadas sobre las placas de Peyer y permiten la liberación del antígeno directamente en células linfáticas (Fig. 1, C); alternatively existe la posibilidad de que las células dendríticas se extiendan a través del epitelio alcanzando el lumen y tomen directamente los antígenos alimentarios (Fig. 1, D) (Chehade y Mayer, 2005).

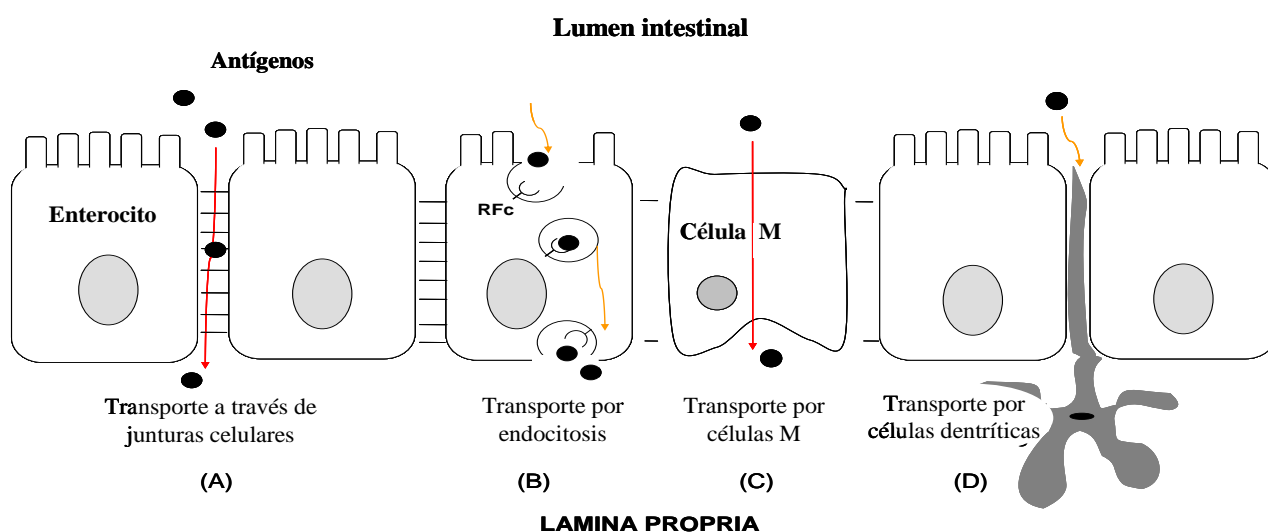


Figura 1. Diferentes rutas de transporte de antígenos en la barrera intestinal.

El paso de antígenos a través de la barrera intestinal puede ser la génesis de la hipersensibilidad a alimentos, que es comúnmente descrita como un fenómeno que consta de dos fases. En la primera fase, denominada fase de sensibilización, los antígenos alimentarios traspasan la barrera intestinal y son capturados por las células inmunes subyacentes. Estos son subsecuentemente procesados y llevados a células inmunes especializadas, conocidas como células presentadoras de antígenos, para finalmente entrar

en contacto con linfocitos T de ayuda (Th). Las citoquinas son proteínas que regulan las funciones celulares, por tanto, el perfil de citoquinas presente en el medio en el que se hallan los linfocitos T vírgenes (Th-0) juega un papel prominente para determinar si estos expresarán un fenotipo Th-1 o un fenotipo Th-2. Los individuos alérgicos desarrollan preferentemente un entorno rico en interleucina (IL) 4, que es la citoquina distintiva de la respuesta alérgica (Th-2) y estimula la diferenciación de linfocitos Th-0 en Th-2, así como la producción de anticuerpos IgE e IgG₁. Otras citoquinas partícipes de la respuesta Th-2 son la IL-13, que también promueve la producción de IgE, la IL-5, que estimula la proliferación de eosinófilos, y la IL-9, que participa en la activación de mastocitos. Además, la IL-25, IL-31 y IL-33 se han asociado recientemente con la respuesta Th-2 (Akdis y Akdis, 2011). El aumento de la respuesta inmune Th-2 va en detrimento de la respuesta Th-1, que predomina habitualmente en individuos no alérgicos. El IFN- γ es la citoquina más representativa de la respuesta Th-1, y destaca por promover la diferenciación de células Th-0 en Th-1 e impedir la de células Th-2, además de inhibir la producción de IgE e IgG₁ y estimular la producción de otras subclases de IgG. El IFN- γ también fomenta la producción de IL-12, que promueve la diferenciación de células Th-0 en Th-1 y a su vez aumenta a la secreción de IFN- γ (Chehade y Mayer, 2005; Abbas y col., 2009).

El desvío hacia una respuesta Th-2 estimula la producción en linfocitos B de IgE específicas del alérgeno; estas se unen a los receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI) presentes en la superficie de los mastocitos y basófilos, y cuando se repite la ingestión del alérgeno ocurre la segunda fase de la respuesta alérgica, conocida como fase efectora. Los fragmentos alérgénicos se unen a las IgE presentes en mastocitos y basófilos, desencadenando la agregación de los receptores y la liberación de mediadores inflamatorios y vasoactivos, fundamentalmente leucotrienos, prostaglandinas e histamina. Posteriormente, la presentación del antígeno conllevará una rápida activación de células Th-2, así como el reclutamiento y la activación de células efectoras como eosinófilos y basófilos (Abbas y col., 2009).

1.2.2 El balance Th-1/Th-2 y las células T-reguladoras

Durante un largo periodo de tiempo, la opinión dominante fue que el balance Th-1/Th-2 jugaba un papel central en la regulación de las respuestas inmunes (Romagnani, 1991). Sin embargo, el modelo no era capaz de explicar aquellos casos en los que se producía la inhibición de ambas respuestas y que podía asociarse con un estado de tolerancia. Ulteriormente, tal situación fue explicada por la actividad del heterogéneo grupo

de células T reguladoras (T-regs). Las células T-regs proceden fundamentalmente de dos linajes, aquellas que derivan naturalmente del timo (nT-regs), y las que son inducidas o adaptativas (iT-regs), pues adquieren funcionalidad después de la estimulación antigénica y en presencia de un perfil de citoquinas concreto (Rolland y col., 2010). Estas últimas desempeñan un papel determinante en la respuesta inmune frente antígenos exógenos como son los de la dieta (**Figura 2**).

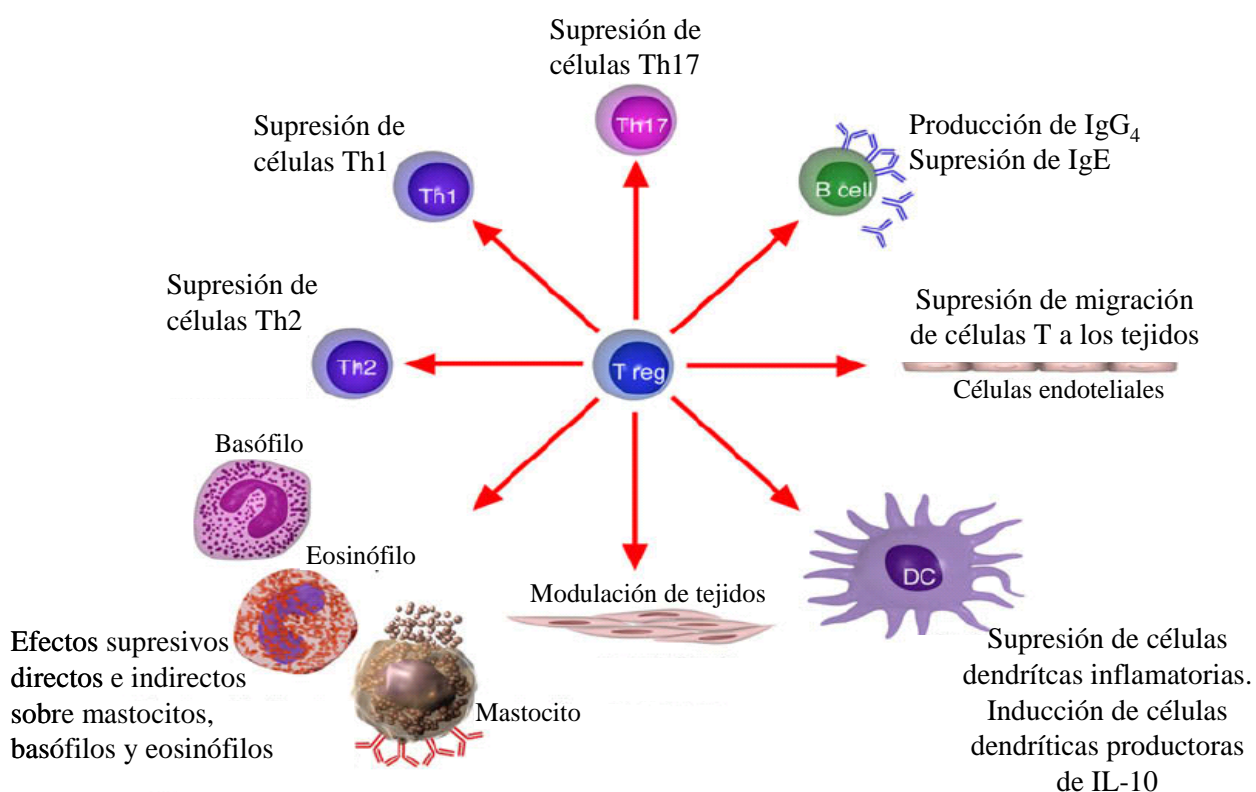


Figura 2. Mecanismos de células T-regs que contribuyen al control de respuestas inmunes frente a antígenos exógenos. Adaptada de Akdis y Akdis (2011).

Las células T-regs han demostrado ser capaces de modular la respuesta alérgica al inhibir células Th-1 y Th-2, ya sea por contacto directo o por producción de citoquinas supresivas como IL-10 y TGF- β (Stock y col., 2006). La IL-10 ha sido descrita como esencial en la tolerancia periférica a alérgenos y se le atribuyen, entre otras funciones, la de suprimir la síntesis de IgE, reducir la liberación de citoquinas proinflamatorias en los mastocitos, inducir la producción de IL-10 en células dendríticas y estimular la producción de IgG₄ y IgA (O'Garra y col., 2008). El TGF- β también puede contribuir a la tolerancia periférica de alérgenos al actuar sinérgicamente con la IL-10, reducir la síntesis de IgE, suprimir la funcionalidad de células Th-1, Th-2 y Th-17, participar en la diferenciación de

células Th-2 en Th-9 y Th-17 e inducir la síntesis de IgA (Letterio y Roberts, 1998). El descubrimiento de las células Th-9 y Th-17 es relativamente reciente, estando ambas implicadas en procesos inflamatorios (Dardalhon y col., 2008; Veldhoen y col., 2008).

Es interesante ver, entre las funciones atribuidas a IL-10 y TGF- β , la de producir IgA, pues se ha barajado durante mucho tiempo la posibilidad de que el desarrollo de una respuesta alérgica pueda estar relacionada con los niveles intestinales de IgA. De hecho, en modelos animales de alergias alimentarias, se han asociado bajas concentraciones de IgA en el intestino con el desarrollo de alergia, sugiriendo el papel fundamental de dicha inmunoglobulina en el desarrollo de la tolerancia periférica. Las placas de Peyer están directamente implicadas en la síntesis de IgA, estimuladas por la presencia de IL-10 y TGF- β , por tanto, la pérdida de la actividad de las células T-regs podría conllevar un aumento en el peso de la respuesta alérgica Th-2; dado que tanto individuos sanos como alérgicos muestran los tres repertorios de células T específicas del alérgeno en cuestión—repertorio Th-1, Th-2 y T-reg—es factible que las variaciones en la proporción de las mismas determinen si se desarrolla una respuesta inmune sana o inica, marcada vehementemente por el ratio de células específicas iT-reg y Th-2 (Akdis y col., 2005).

1.3 Alérgenos de huevo

En general, los alérgenos alimentarios son proteínas de la dieta con una masa molecular comprendida entre 10 y 70 kDa (Mills y col., 2004), aunque hay excepciones, como el alérgeno Ara h 1 del cacahuete, con una masa molecular mayor de 250 kDa (Maleki y col., 2000). Las proteínas causantes de reacciones alérgicas suelen ser abundantes en el alimento, por ejemplo, los alérgenos mayoritarios de la leche, huevo, pescado y cacahuetes comprenden del 25 al 50% del total de proteínas presentes en alimento. También han de poseer cierta estabilidad estructural ya que, para sensibilizar a un individuo vía gastrointestinal, deben ser capaces de resistir el procesado y preservar en parte sus epítomos—que son aquellas regiones de la proteína implicadas en la respuesta alérgica—durante la digestión, soportando pHs ácidos, proteólisis, surfactantes, etc (Astwood y col., 1996); de hecho, muchos de los alérgenos alimentarios son proteínas estables, resistentes al calentamiento, como la β -lactoglobulina de la leche (Wal, 1998), y a la acción de enzimas digestivas, como la parvalbúmina de bacalao (Bugajska-Schretter y col., 1998). Además, se sabe que muchas de las proteínas alergénicas tienen punto isoeléctrico (pI) ácido y contienen modificaciones traslacionales, como fosforilación o adición de fracciones glicosiladas en su estructura (Bredehorst, 2001).

El huevo presenta alérgenos tanto en la clara como en la yema aunque se sabe que el potencial alergénico del huevo se halla fundamentalmente en la clara. Ya en los años cincuenta se trataba de identificar alérgenos de la clara de huevo realizando test de reacción cutánea a pacientes alérgicos a huevo (Miller y Campbell, 1950). En los años ochenta se emplearon técnicas de radioalergosorbencia y radioinmunolectroforesis cruzada, estableciéndose la ovoalbúmina (OVA o Gal d 2), el ovomucoide (OM o Gal d 1) y la ovotransferrina (OT o Gal d 3) como alérgenos mayoritarios (Hoffman, 1983). Posteriormente, la lisozima (LYS o Gal d 4) fue también reconocida como alérgeno mayoritario del huevo (Holen y Elsayed, 1990). En un esfuerzo por establecer cuales de los alérgenos de huevo eran verdaderamente alérgenos mayoritarios, se llevó a cabo un estudio centrado en evaluar la unión específica de IgE frente a 8 proteínas de huevo usando suero de 48 niños alérgicos (Walsh y col., 2005). Tal estudio confirmó que los alérgenos mayoritarios de huevo se hallaban fundamentalmente en la clara de huevo e incluían OVA, OM, OT y LYS. En la actualidad es ampliamente aceptado que la OVA y el OM son los alérgenos principales del huevo (Mine y Yang, 2008) debido a sus propiedades moleculares e inmunológicas, así como a su comportamiento frente al procesado, aspectos que son revisados en los siguientes apartados.

1.3.1 Ovoalbúmina

La OVA es una fosfoglicoproteína de una masa molecular de 45 kDa y es la proteína más abundante de la clara de huevo, contando con un 54% (p/p) del contenido proteico. La secuencia completa de 385 aminoácidos ha sido descrita (McReynolds y col., 1978; Nisbet y col., 1981) y su estructura tridimensional ha sido estudiada por cristalografía de rayos X, observándose tres láminas β y nueve hélices α (Stein y col., 1990). La OVA contiene una unidad de carbohidratos, puede presentar hasta dos residuos de fosfoserina, un puente disulfuro y cuatro grupos sulfidrilos, tres de los cuales son poco reactivos en la forma nativa, mientras que el cuarto es altamente reactivo cuando la proteína se desnaturaliza. La mitad de los residuos de aminoácidos de la OVA son hidrofóbicos y un tercio presenta residuos cargados, la mayoría ácidos, confiriéndole a la proteína un pI de 4.5 y una temperatura de desnaturalización de 84°C (Li-Chan y Nakai, 1989).

Un hecho interesante en la estructura de la OVA es su homología con la superfamilia de las serpinas (serinas inhibidoras de proteasas), que son un grupo de proteínas, presente en todos los organismos eucariotas, con actividad inhibidora de

proteasas (Huntington y Stein, 2001). No obstante, la OVA no muestra tal actividad inhibidora de proteasas y, aparte su papel como fuente importante de aminoácidos, no se le han atribuido funciones biológicas todavía. La OVA ha sido ampliamente usada, no solo como modelo estándar para estudios estructurales y funcionales de proteínas, sino como antígeno modelo en modelos animales experimentales de alergias alimentarias y asma, habiendo sido identificados los epítomos dominantes de unión a IgE en humanos y en ratones (Mine y Rupa, 2003; Mine y Yang, 2007).

1.3.2 Ovomucoide

El OM tiene una masa molecular de 28 kDa y un pI de 4.82. Representa el 11% (p/p) de las proteínas de la clara de huevo. Se encuentra altamente glicosilado, conteniendo un 20-25% de fracciones de carbohidratos. El OM comprende 186 aminoácidos organizados en tres dominios estructuralmente independientes (Gal d 1.1, 1.2 y 1.3), y posee 9 puentes disulfuro intermoleculares. El OM presenta capacidad de reducir la actividad de algunas enzimas digestivas, como la tripsina y quimotripsina (Konishi y col., 1985), así como un gran potencial alergénico. El dominio Gal d 1.3 es considerado como la fracción inmunodominante del OM en humanos alérgicos a huevo ya que mostró mayor actividad de unión a IgE e IgG que los dominios I y II (Zhang y Mine, 1998). Las propiedades alergénicas del OM se han descrito extensamente y los epítomos de células B y T han sido identificados tanto en pacientes alérgicos a huevo como en ratones (Holen y col., 2001; Mine y Zhang, 2002; Mizumachi y Kurisaki, 2003).

1.3.3 Lisozima

La LYS, aun no siendo tan alergénica como la OVA o el OM, es ampliamente usada por sus propiedades antibacterianas para prevenir infecciones, lo que aumenta el riesgo de exposición y hace que sus propiedades alergénicas despierten mayor interés. La LYS es una proteína de 129 aminoácidos y masa molecular de 14.3 kDa (Mine y Yang, 2008). Es de carácter básico, con un pI de 10.7; presenta 4 puentes disulfuro en su estructura que confieren estabilidad y, a diferencia de OVA y OM, no tiene carbohidratos en su estructura. Fue la primera proteína en ser secuenciada y su estructura tridimensional fue analizada viéndose que consiste en dos dominios unidos por una α -hélice, donde se encuentra el sitio activo de la enzima (Young y col., 1994). Sus grupos polares se encuentran en la superficie, mientras que la mayoría de los hidrófobos están en el interior. Representa un 3.5% del contenido proteico de la clara de huevo, y se caracteriza por su

capacidad antibacteriana, especialmente frente a bacterias gram positivas, dada su habilidad para hidrolizar el enlace glucosídico. También es señalada por su potencial alergénico, habiéndose realizado algunos estudios en ratones para identificar epítomos de células T (Gammon y col., 1991; Moudgil y col., 1997), pero no en humanos, estando la caracterización de epítomos de LYS relevantes en la alergia a huevo incompleta.

2. Efecto del procesado en alérgenos alimentarios

Los alimentos e ingredientes alimentarios están sujetos a una gran variedad de condiciones de procesado enfocadas a mejorar las propiedades organolépticas y/o funcionales, asegurar la calidad microbiológica del alimento, modificar sus características para adecuarlos a su uso final o aislar determinados compuestos del alimento inicial (Thomas y col., 2007). El procesado de alimentos puede inducir cambios físicos, químicos y físico-químicos que afecten sensiblemente el potencial alergénico de las proteínas alimentarias mediante el efecto provocado en su estructura dependiendo del tipo de procesado, duración e intensidad (Wal, 2003; Sathe y col., 2005).

Generalmente, a través del procesado de alimentos se puede disminuir la alergenicidad, ya sea por destrucción, modificación o enmascaramiento de epítomos. Se habla de epítomos conformacionales (**Figura 3**) cuando se hallan formados por diversas regiones separadas en la secuencia proteica primaria, que se aproximan por el plegamiento tridimensional de la proteína; por tanto, los cambios conformacionales causados por el procesado suelen ser críticos para esta clase de epítomos, aunque no se puede descartar una posible formación de nuevos puntos de unión a IgE dependiendo del desplegamiento de la proteína y de su reorganización espacial. Se habla de epítomos lineales (**Figura 3**) cuando se encuentran formados por aminoácidos contiguos en la

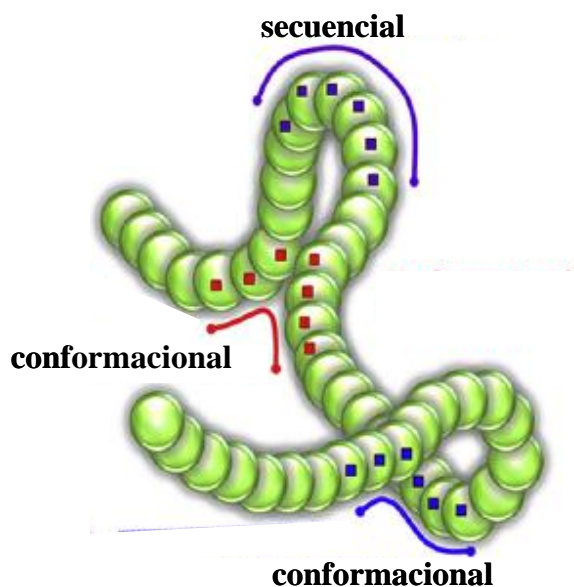


Figura 3. Clases de epítomos. Adaptado de Konstantinuo y col. (2012).

secuencia primaria de la proteína. Los epítomos lineales son críticos en aquellos casos de alergia persistente y es más factible que estos se alteren, por ejemplo, por hidrólisis enzimática que por cambios conformacionales (Urisu y col., 1999).

Otro aspecto fundamental en la comprensión del efecto del procesado sobre el potencial alergénico de un alimento es cómo afecta el procesado la digestión gastrointestinal del alérgeno, ya que puede modificar la susceptibilidad a la hidrólisis del mismo. Por ejemplo, en el caso de la β -lactoglobulina, presente en el suero lácteo, el tratamiento térmico no es suficiente para eliminar su alergenicidad, mas consigue aumentar su digestibilidad, reduciendo notablemente su capacidad de desencadenar una respuesta alérgica (Ehn y col., 2004). La resistencia a la digestión gastrointestinal se considera una característica importante de los alérgenos alimentarios, que deben ser capaces de conservar los epítomos, a pesar de las condiciones ácidas y enzimáticas del aparato digestivo, y alcanzar el sistema inmune a través del intestino con capacidad de desencadenar una respuesta alérgica (Astwood y col., 1996).

2.1 Tratamiento térmico

De modo general, los tratamientos térmicos son aplicados a los alimentos con dos objetivos: mantener o mejorar la calidad microbiológica del alimento (pasteurización, esterilización, refrigeración, congelación) y/o conseguir la adecuación culinaria para su consumo (asado, hervido, cocido, frito, escalfado, ahumado, secado, aliñado, etc.). El tratamiento térmico de las proteínas alimentarias produce diversas modificaciones abarcando desnaturalización, hidrólisis de enlaces peptídicos, agregación por enlaces no covalentes y puentes disulfuro, y reacciones con otras moléculas del alimento ya sean lípidos o carbohidratos. Dependiendo de la proteína, se sabe que la pérdida de la estructura secundaria ocurre a 55-70°C, la rotura de puentes disulfuro a 70-80°C, la formación de nuevas interacciones intra o inter moleculares y reordenamiento de los puentes disulfuro a 80-90°C y agregación a 90-100° con la subsiguiente pérdida de la estructura terciaria (Wal, 2003). Como cabe esperar, este amplio abanico de reacciones puede afectar ostensiblemente la alergenicidad de las proteínas. Por ejemplo, los alérgenos Mal d 1 de la manzana (Scheurer y col., 2004), Pru av 1 de la cereza (Bohle y col., 2006), Api g 1 del apio (Jankiewicz y col., 1997) y Cor a 1.04 de avellana (Pastorello y col., 2002) ven reducida su alergenicidad por la pérdida de epítomos conformacionales debido al desdoblamiento de la proteína calentada. En contraposición, también puede producirse el efecto opuesto y que se incremente la alergenicidad por favorecer el acceso a epítomos

encriptados tras desdoblarse la proteína, o por formación de nuevos epítomos a consecuencia de plegamientos tras la desnaturalización del alérgeno (Besler y col., 2001; Molina y col., 2009). Además, no se puede obviar el efecto del procesado sobre la digestibilidad, como mencionábamos con anterioridad.

En el huevo, el tratamiento térmico se suele utilizar para mejorar la textura, el sabor, o por seguridad microbiológica, y no con la finalidad de reducir su alergenicidad. No obstante, el efecto del tratamiento térmico en el huevo ha sido ampliamente estudiado; por ejemplo, al comienzo de los años de los ochenta, se publicó que el huevo hervido (100°C durante 3 y 20 min) mostraba una antigenicidad reducida (Hoffman, 1983). En estudios *in vitro* con clara de huevo se aportaron resultados parecidos: al calentar la clara a 90°C durante 10 min la capacidad de unión a IgE de 16 pacientes alérgicos a huevo disminuyó por encima del 50% (Anet, 1985). Más recientemente, un estudio realizado en dos pacientes que habían sufrido reacciones anafilácticas al ingerir huevo crudo reveló que tales afecciones no se reproducían cuando lo consumían cocinado (Eigenmann, 2000). En la misma línea, se han realizado estudios clínicos en los que concluyeron que alrededor de un 70% de los niños alérgicos a huevo eran capaces de tolerar huevo como ingrediente de distintos tipos de bollería (Roches y col., 2006; Lemon-Mule y col., 2008). En un estudio actual, y de acuerdo con lo descrito en la bibliografía, se observó que un 66% de niños alérgicos a huevo ingerían clara de huevo pasteurizada sin presentar síntomas de alergia (Jurado-Palomo y col., 2010).

Si centramos la revisión bibliográfica en los alérgenos principales del huevo, OVA y OM, encontramos que sus comportamientos difieren cuando son sometidos a tratamiento térmico. La OVA pierde una notable capacidad de unión a IgE por calentamiento a 80°C durante 3 minutos (Honma y col., 1994), pero el hecho de que presente en su estructura tanto epítomos lineales como conformacionales, hace posible que mantenga cierta alergenicidad después del tratamiento térmico (Hoffman, 1983; Mine y Zhang, 2002). Otro aspecto importante, como anotábamos previamente, es la estabilidad del alérgeno frente al proceso digestivo. En un primer momento, fue publicado que la OVA era estable a la acción de la tripsina, pero susceptible a la de la pepsina (Elsayed y col., 1986), aunque finalmente se ha comprobado que es muy estable en medio gástrico y duodenal (Martos y col., 2010). En cambio, cuando es sometida a tratamiento térmico (100°C durante 5 min), la digestibilidad aumenta notablemente, tanto a nivel gástrico como duodenal (Takagi y col., 2003), lo cual podría reducir su potencial alergénico.

A diferencia de la OVA, el OM no es coagulable por calor (Urisu y col., 1997) y retiene alergenicidad después de calentamiento prolongado a elevada temperatura (Gu y col., 1986). Tal estabilidad es atribuida al alto contenido de carbohidratos y los nueve puentes disulfuro presentes en su estructura (Hirose y col., 2004). Urisu y col. (1997) dirigieron un estudio clínico en el que se administró clara de huevo calentada (90°C durante 60 min) con el contenido de OM habitual, o habiéndose reducido, a pacientes alérgicos a huevo. La mitad de los pacientes toleraron la clara de huevo calentada mientras que la clara de huevo calentada con bajo contenido en OM fue tolerada por un 95% de los pacientes. Este estudio reveló la importancia del OM en la alergia a huevo, posiblemente debido a su estabilidad térmica, en comparación con otros alérgenos reconocidos de la clara de huevo que son termolábiles, como la OVA, OT y LYS. Respecto a la estabilidad del OM en medio gastrointestinal, se sabe que se digiere con pepsina dando lugar a tres bandas observadas por SDS-PAGE, mas tales bandas muestran estabilidad en medio duodenal, lo cual puede ser en parte atribuible a su actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina (Kovacs-Nolan y col., 2000). La gran estabilidad que exhibe el OM frente al tratamiento térmico hace pensar que este no modificará su digestibilidad, sin embargo, el calentamiento puede favorecer la interacción del mismo con otro tipo de moléculas presentes en la matriz del huevo, como carbohidratos y/o lípidos, produciendo modificaciones estructurales que podrían afectar finalmente su alergenicidad y digestibilidad.

2.2 Almacenamiento

El almacenamiento de los alimentos puede dar lugar a modificaciones estructurales de los alérgenos que contienen hasta que son consumidos. En el caso del huevo, es sabido que la OVA sufre cambios estructurales durante el almacenamiento, generando la llamada S-OVA (Smith y Back, 1965). La formación de S-OVA conlleva una serie de cambios conformacionales, que todavía son objeto de investigación, aunque se acepta que la estructura de la OVA y la S-OVA son muy semejantes. No obstante, se han descrito diferencias: la Ser 164, Ser 236, Ser 320 toman la configuración D y las cadenas laterales de Phe 99 y Met 241 sufren alteraciones significativas en la S-OVA (Yamasaki y col., 2003; Ishimaru y col., 2010); también hay un incremento de láminas β antiparalelas junto con un descenso de hélices α (Kint y Tomimatsu, 1979). Dichas modificaciones resultan en una mayor termoestabilidad de la S-OVA, que presenta una temperatura de desnaturalización de 92.5°C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Donovan y col., 1975). La formación de S-OVA es progresiva, pudiendo

distinguirse formas intermedias entre OVA y S-OVA hasta que la formación completa de esta última se consuma. Los estados intermedios pueden ser fácilmente distinguidos por DSC (Hegg y col., 1979).

En la clara de huevo fresca puede haber hasta un 5% de S-OVA, aunque más de la mitad de la OVA se convierte en S-OVA en el tiempo transcurrido hasta que los huevos llegan al consumidor (Lechevalier y col., 2007). Después de seis meses de almacenamiento a baja temperatura el porcentaje de S-OVA puede alcanzar un 81% (Vadehra y Nath, 1973). La S-OVA también se puede formar *in vitro* en medio alcalino y elevada temperatura. Por ejemplo, Donovan y col. (1975) prepararon S-OVA rápidamente, incubando OVA a 50°C durante 20 horas en tampón fosfato sódico 100 mM y pH 10.

La formación de S-OVA está normalmente asociada con una pérdida de funcionalidad de la clara de huevo, ya que reduce la consistencia de la clara y su capacidad coaguladora (Shitamori y col., 1984). La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre la S-OVA se han centrado en la calidad organoléptica de los huevos almacenados y de los productos relacionados (Huntington y Stein, 2001), mas no en aspectos relacionados con el potencial alergénico de la S-OVA ni en su estabilidad en medio gastrointestinal, siendo estos de interés, dado que la S-OVA se ha descrito como una forma más estable que la OVA y dicha estabilidad podría también manifestarse a nivel intestinal resultando en una mayor alergenicidad.

3. Efecto de la matriz

El comportamiento de los alérgenos en la matriz alimentaria se ha convertido recientemente en un candente tema de investigación. Usualmente se afronta el estudio de alérgenos alimentarios a partir de extractos o formas puras, lo que facilita la tarea. Sin embargo, raros son los casos en los que nos exponemos al alérgeno en una forma purificada o aislada. Por tanto, el alcance de conclusiones más relevantes, en cuanto a la alergenicidad de las proteínas alimentarias y su comportamiento en condiciones fisiológicas, requiere el estudio de las mismas en las matrices en las que son habitualmente procesadas y consumidas, o al menos en modelos experimentales que asemejen tales condiciones. Se sabe que los alérgenos alimentarios pueden interaccionar con otros compuestos que estén en la matriz, siendo los más habituales carbohidratos y lípidos. Tales interacciones pueden resultar en un aumento o descenso del potencial alergénico y afectar el modo en el que son digeridos y/o reconocidos los alérgenos a nivel

celular y, por ende, su capacidad de desencadenar una respuesta inmune (Thomas y col., 2007) (**Figura 4**).

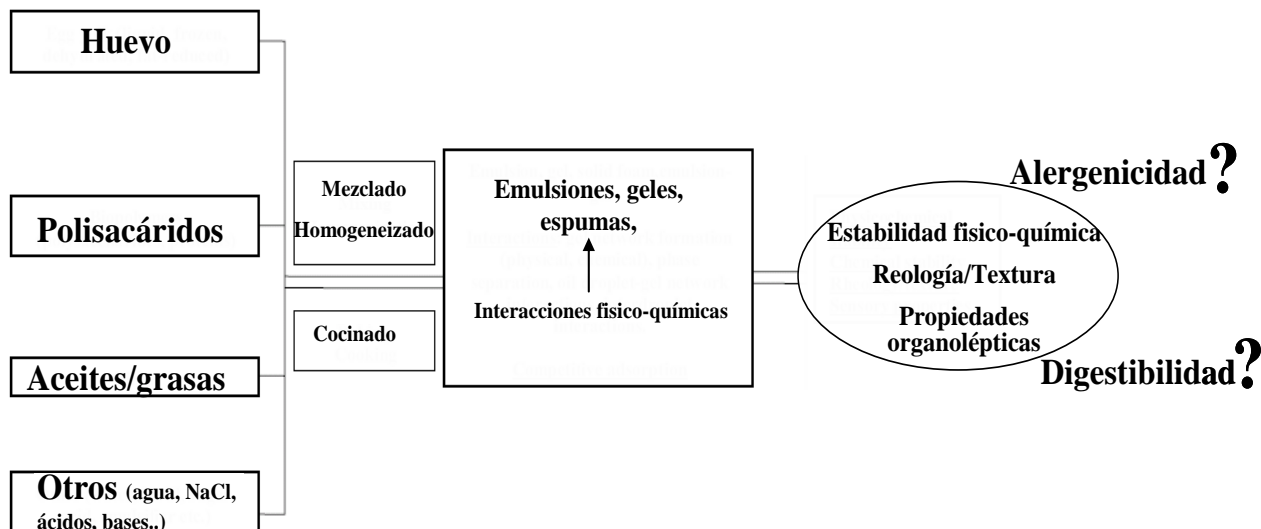


Figura 4. Interrogantes relativos a la matriz y procesado del huevo.

3.1 Interacción con carbohidratos

3.1.1 Reacción de Maillard (RM)

La RM (Maillard, 1912) es una reacción no enzimática, que sucede entre grupos amino libres y azúcares reductores en los alimentos durante el tratamiento térmico o almacenamientos largos, bajo unas condiciones determinadas (Nursten, 1981). Es un denso entramado de reacciones que ha sido objeto de numerosos estudios (Friedman, 1996; Martins, 2000; Jiménez-Castaño y col., 2007) y consta de tres etapas: inicial, intermedia y final (Hodge, 1953).

La etapa inicial de la RM es la mejor caracterizada, comienza con la condensación del grupo carbonilo de un azúcar reductor con un grupo amino libre, liberándose agua para formar una base de Schiff, que sufre una posterior ciclación transformándose en una glicosilamina N-sustituida inestable, que finalmente se reordena irreversiblemente dando el compuesto de Amadori, cuando el azúcar reaccionante es una aldosa, o el compuesto de Heyns, si el azúcar reaccionante es una cetosa (Matsuda y col., 1991). Durante la primera etapa las proteínas no sufren alteraciones estructurales importantes ni se produce formación de color (Oliver, 2006). Durante la etapa intermedia se produce la fragmentación de azúcares y la degradación de aminoácidos (degradación de Strecker). El compuesto de Amadori o

Heyns, puede experimentar varias reacciones de degradación irreversibles, generándose una gran variedad de compuestos que todavía están pobremente caracterizados (Ledl, 1990). La etapa final de la RM supone una serie de reacciones de ciclación, deshidratación, retroaldolización, reordenamiento, isomerización y condensación de los productos iniciales de la reacción, dando lugar a la formación de compuestos poliméricos, coloreados, e insolubles en agua, denominados melanoidinas (Friedman, 1996).

Los factores principales que afectan el desarrollo de la RM han sido estudiados, siendo temperatura y tiempo de calentamiento, a_w , pH del medio, y naturaleza y concentración de los reactantes los más importantes. La temperatura y tiempo de calentamiento son considerados los factores más determinantes de la RM, estando ampliamente aceptado que el incremento de la temperatura, así como el tiempo de almacenamiento, favorecen de forma exponencial la RM (Ryu y col., 2003).

En general, el aumento de la a_w produce un incremento de la RM, hasta alcanzar un máximo, a partir del cual disminuye la reacción, posiblemente debido a la dilución de los reactivos. Diversos autores han demostrado que el intervalo óptimo de a_w es entre 0.3 y 0.7 (Labuza, 1977). El desarrollo de la RM está fuertemente condicionado por el pH, así como por la capacidad tamponadora del sistema. En condiciones ácidas (pH 3) la velocidad de la reacción es mínima y su desarrollo escaso (Lea y Hannan, 1949). Por lo general, la velocidad de la reacción aumenta en condiciones ligeramente alcalinas (Namiki y col., 1993; Ajandouz y Puigserver, 1999) considerándose el rango de pH 6 a 8 es idóneo para el desarrollo de la RM, pudiéndose ampliar hasta pH 10.

Por supuesto, la naturaleza y concentración de los reactantes influye en la RM. Los grupos de aminoácidos más reactivos son el ϵ -amino libre de Lys y α -amino terminal. Por ende, con un mayor contenido en residuos de Lys podría alcanzarse un mayor grado de glicación de la proteína. El grupo imidazol de la His, el grupo indol del Trp, y el grupo guanidino de los residuos de Arg también son susceptibles de reaccionar con azúcares reductores, pero en menor medida (Oliver, 2006). Se sabe que la OVA contiene 20 Lys y 15 Arg mientras que el OM presenta, respectivamente, 14 y 5 (www.rcsb.org). Estos aminoácidos tienen grupos amino libres que podrían participar en la RM, aunque con distinta disponibilidad.

Respecto al carbohidrato, se ha descrito que la reactividad de los azúcares reductores disminuye al aumentar el peso molecular (Nacka y col., 1998). A su vez, la reactividad de los monosacáridos va a afectar la RM, siendo las aldosas intrínsecamente más reactivas que las cetosas (Yeboah y col., 1999), aunque se ha descrito que las cetosas podrían dar lugar a un mayor entrecruzamiento y agregación proteica durante las etapas avanzadas de la RM (Sun y col., 2004; Sun y col., 2006). Obviamente, la concentración de reactantes afecta la reacción, viéndose favorecida con exceso de azúcares reductores en el medio (Warmbier y col., 1976).

3.1.2 Influencia de la reacción de Maillard en la alergenidad

La RM es una de las reacciones químicas principales que pueden influir en la alergenidad de las proteínas alimentarias. La unión de polisacáridos a proteínas por RM va a ser más limitada que la de oligosacáridos, fundamentalmente por impedimento estérico (Jiménez-Castaño y col., 2005). Se sabe que la unión de hidratos de carbono a proteínas alimentarias puede variar su alergenidad ya sea modificando la estructura terciaria con la subsiguiente destrucción o enmascaramiento de epítopos conformacionales, creando nuevos sitios de unión a IgE o exponiendo aquellos que estuviesen ocultos en la estructura. Se ha descrito que la RM puede generar nuevos sitios de unión a IgE en los alérgenos del cacahuete (Maleki y col., 2000; Gruber y col., 2005). En cambio, también se ha descrito que puede disminuir la capacidad de unión a IgE, como es el caso del alérgeno mayoritario de la cereza, Pru av 1, que ve reducida tal capacidad cuando es glicosilado con glucosa y ribosa (Gruber y col., 2004). Además se ha barajado la posibilidad de que los nuevos antígenos formados por glicación se unan a receptores diferentes, con lo cual, su reconocimiento, transporte y presentación por células presentadoras de antígenos seguiría otras vías de señalización distintas, resultando en respuestas inmunes diferentes respecto de la proteína nativa (Maleki y col., 2000).

Otro aspecto a tener en cuenta es que los cambios conformacionales y físico-químicos relacionados con la glicación pueden modificar la susceptibilidad de la proteína a la acción de las enzimas digestivas, así como su absorción intestinal, con el subsiguiente efecto en el potencial alérgico (Corzo-Martinez y col., 2010). Muchas proteínas modificadas mediante RM han mostrado mayor resistencia al proceso digestivo, probablemente porque la reactividad de tripsina es menor frente a residuos de Lys y Arg glicosilados en comparación con los nativos (Moreno y col., 2008). En

contraposición, ha sido publicado que los estados avanzados de la RM pueden favorecer la digestibilidad de las proteínas al exponer partes de la proteína susceptibles de ser hidrolizadas, debido a los cambios conformacionales producidos durante la glicosilación (Yeboah y col., 2004).

Las proteínas de la clara de huevo se desnaturalizan y vuelven insolubles a temperaturas relativamente bajas, por ejemplo, a pH neutro la OT se desnaturaliza a 61°C y la LYS a 75°C (Donovan y col., 1975); por esta razón, a nivel industrial es preferido el proceso de atomización. Durante este proceso es factible que la glucosa presente en la clara, alrededor de un 4% del peso en sólidos, reaccione con los grupos amino libres de los alérgenos principales, OVA y el OM, pudiendo desarrollarse colores y sabores no deseados, incluso después de periodos cortos de almacenamiento a temperatura ambiente. Por ello, en la práctica industrial, la clara de huevo es sometida a un proceso de eliminación del poder reductor antes de ser atomizada, para proteger el producto de la RM durante el calentamiento y el almacenado (Sisak y col., 2006). No obstante, durante el proceso de secado y ulterior almacenamiento, y dependiendo de la eficacia del proceso de eliminación de azúcares, no se puede excluir la posibilidad de que los grupos amino de OVA y OM sean glicosilados como consecuencia de la RM, con los subsiguientes modificaciones conformacionales, pudiendo afectar su digestibilidad y alergenicidad. Aunque el efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas de huevo ha sido objeto de estudio (Smith, 1964; Donovan y col., 1975; Urisu y col., 1997; Peng y col., 1998; Mine y Zhang, 2002; Photchanachai y col., 2002; Takagi y col., 2003; Talansier y col., 2009), hay pocos trabajos sobre el efecto de la RM en OVA y OM (Kato y col., 1978; Handa y Kuroda, 1999; Rupa y col., 2007; Ilchmann y col., 2010), lo que hace interesante seguir profundizando en el efecto de la glicosilación sobre la alergenicidad de los alérgenos dominantes de la clara de huevo.

3.1.3 Otras interacciones: polisacáridos de interés alimentario.

Las proteínas y los polisacáridos son biopolímeros naturales que pueden ser empleados como ingredientes funcionales, de hecho, las mezclas de proteínas y polisacáridos son usadas frecuentemente con aplicación tecnológica en la industria cosmética, farmacéutica y en la alimentaria. En esta última es común el uso de mezclas proteína-polisacárido por su capacidad estabilizante para preparar dispersiones alimentarias. Además, los efectos sinérgicos que resultan de la mezcla de estos

biopolímeros son de excelente utilidad para la industria alimentaria por la mejora que se consigue en muchos alimentos, por reducir el precio de producción además de crear nuevas nano-, micro- o macroestructuras que mejoran las propiedades organolépticas y reológicas del alimento.

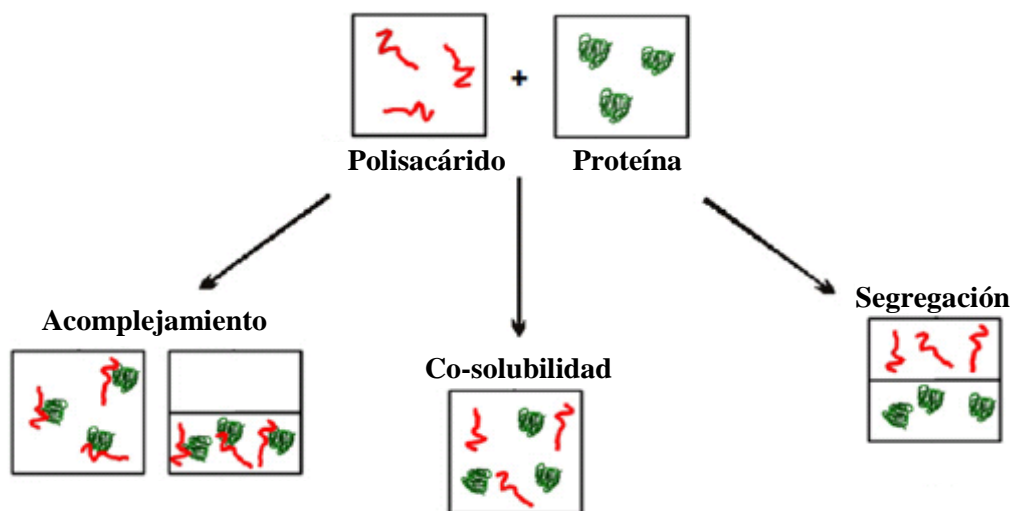


Figura 5. Comportamiento de mezclas proteína-polisacárido. Adaptado de Patino y Pilosof (2011).

En las mezclas de proteínas y polisacáridos, estos pueden unirse mediante enlaces covalentes generando conjugados específicos, fuertes y relativamente estables, como ocurre cuando se da RM. También pueden asociarse por interacciones no covalentes, por ejemplo electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, exclusión estérica, etc (Patino y Pilosof, 2011).

Cuando la proteína se mezcla con el polisacárido pueden darse diversos comportamientos que se hallan ilustrados en la **Figura 5**. Si las mezclas están muy diluidas son estables, dado que la entropía de la mezcla aumenta dándose co-solubilidad de proteínas y polisacáridos. Cuando la concentración de ambos biopolímeros aumenta ocurren fenómenos de segregación o agregación. Las interacciones atractivas entre las proteínas y los polisacáridos pueden dar lugar a la formación de complejos solubles o insolubles. La formación de complejos insolubles provoca una separación de fases, llamada coacervación o separación asociativa. El acomplejamiento de proteínas-polisacáridos es de origen físico y sucede a través de enlaces iónicos, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, cuando los polisacáridos se encuentran cargados, la contribución de fuerzas electrostáticas es predominante. Cuando

se dan interacciones repulsivas desfavorables entre polímeros de distinta naturaleza química aumenta la probabilidad de que se dé una exclusión mutua en los alrededores de cada polímero. Normalmente, la incompatibilidad en las mezclas de proteínas-polisacáridos se da a pH superior al pI de las proteínas o en condiciones de elevado estrés iónico. Por tanto, el control del pH y el estrés iónico de la fase acuosa son críticos a la hora de controlar las interacciones proteína-polisacárido en la mezcla (Patino y Pilosof, 2011).

La utilización de polisacáridos solubles de origen vegetal en la industria alimentaria es muy frecuente, debido fundamentalmente a las propiedades tecnológicas de que gozan, destacando la capacidad gelificadora, espesante, emulsionante y estabilizante. Por ejemplo, la presencia de pectinas, goma arábiga, goma guar, alginatos, y carragenanos en alimentos tales como yogur batido, mermeladas, flan, natillas, cremas, helados y puddings es habitual. Además, muchos son componentes naturales de cereales, como es el caso de la xilosa, o de frutas y cítricos, como es el caso de la pectina.

La **pectina** (P) es un componente mayoritario de las paredes celulares de plantas terrestres y algas verdes, donde juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las mismas (Willats y col., 2001). Los extractos de P son ampliamente usados en la industria alimentaria como ingrediente funcional (E-440) y están presentes en muchos alimentos, verbigracia helados, mermeladas, gelatinas y bebidas lácteas; de hecho, en la dieta occidental se consumen alrededor de 4-5 gramos de P diariamente (Willats y col., 2006). La P es un biopolímero compuesto esencialmente de residuos de ácido D-galacturónico, cuya presencia es responsable del carácter polianiónico de las pectinas, que tienen un pI entorno a 3. Se reconocen en su composición homogalacturonanos no ramificados, rhamnogalacturonanos ramificados de tipo I y rhamnogalacturonanos de tipo II. El grado de metil-esterificación (ME) y los patrones de distribución de metil-ésteres, son importantes para determinar las propiedades funcionales, en especial la gelificadora. En la P con elevado grado de ME las zonas de unión están formadas por entrecruzamiento de cadenas de homogalacturonanos no ramificados por puentes de hidrógeno y fuerzas hidrófobas entre los grupos metoxilo, ambas promovidas por elevadas concentraciones de azúcar y acidez. Este tipo de gelificación hace posible muchos de los usos comerciales de la P, por ejemplo en mermeladas y gelatinas. En la P de bajo ME las zonas de unión están formadas por entrecruzamientos de calcio y grupos carboxilo libres (Willats y col., 2001; Sorensen y col., 2009).

La **goma arábica** (G), también llamada goma de acacia, es un polisacárido extraído de la resina de distintas especies de árboles subsaharianos (*Acacia senegal* y *polyacantha*) como parte del proceso de cicatrización de estos (gummosis). La G es empleada en la industria alimentaria como aditivo bajo el nombre E-414, o goma de acacia, y tiene un alto contenido en fibra soluble, lo que hace que se empiece a reconocer como fibra alimentaria, aunque fundamentalmente se usa como agente espesante, emulsificante y estabilizante, por ejemplo en siropes y golosinas esponjosas como las “nubes” (Benech, 2008; Ali y col., 2009; Phillips y Phillips, 2011). La G es un polisacárido complejo, ramificado y de elevado peso molecular, de carácter neutro o ligeramente ácido, cuyo cuerpo está compuesto por unidades de D-galactopiranosil unidas por enlace β (1,3). Se ha descrito que la G está compuesta por un 39-42% de galactosa, 24-27% arabinosa, 12-16% de rhamnosa, 15-16% de ácido glucurónico, 1.5-2.6% de proteína, 0.22-0.39% de nitrógeno y un 12.5-16% de humedad, aunque la composición química puede variar dependiendo de la edad de los árboles de los que se obtiene, las condiciones climáticas y la contaminación ambiental (Benech, 2008; Ali y col., 2009; Phillips y Phillips, 2011).

El **xilano** (X) es una de las hemicelulosas más comunes y de los polímeros más abundantes en el reino de las plantas. En las plantas terrestres el X presenta una variedad de cadenas laterales unidas a la principal de β -1,4-D-xilopiranososa e incluyen unidades de α -L-arabinofuranosil y α -D-glucopiranosil. Además, también han sido identificadas en su estructura rhamnosa, xilosa, galactosa, glucosa y una gran variedad de cadenas laterales diméricas y triméricas. Las mayores fuentes de X son la madera de dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y semillas y granos de cereal. La fibra de algunos cereales de plantas agrícolas producidas industrialmente es fuente de X, por ejemplo, la fibra de maíz, que es un producto derivado de la producción de maíz, contiene más de un 50% de heteroxilano altamente ramificado y de gran viscosidad que en la actualidad se llama “*corn fiber gum*” y se usa como goma alimentaria, espesante y adhesivo. Además, entre las propiedades funcionales atribuidas a los polisacáridos se han descrito la capacidad emulsionante y estabilizante, lo que los hace de gran interés para la industria alimentaria (Ebringerova y Hromadkova, 1999; Kacurakova y col., 1999; Ebringerova y Heinze, 2000).

3.1.4 Mezclas polisacárido-proteína: influencia en la alergenidad.

Si bien no es habitual, se han descrito casos de alergias frente algunos polisacáridos de frecuente uso alimentario. Verbigracia, existen casos de pacientes que desarrollaron alergia ocupacional—que es aquella reacción alérgica frente a alguna sustancia presente en el lugar de trabajo, producida normalmente por inhalación o contacto—a la G (Foetisch y col., 1998; Sander y col., 2006). Además, Foetisch y col. (1998) demostraron que, tras eliminar el contenido proteico de la G, los anticuerpos IgE del paciente eran específicos de epítomos presentes en los carbohidratos. También se han descrito casos de alergia ocupacional frente a P (Rasanen y col., 1998); por ejemplo Kraut y col. (1992) publicaron el caso de un trabajador de la industria de las golosinas que desarrolló alergia frente a P.

Aunque conviene tener presente la posibilidad de que algunos de los polisacáridos empleados en la industria alimentaria sean alergénicos para ciertos individuos, en general, la influencia de los mismos sobre la alergenidad del alimento proviene de las interacciones que puedan tener con las proteínas alergénicas contenidas en la matriz alimentaria. En ese sentido, se ha visto que los polisacáridos pueden afectar la digestibilidad y alergenidad de antígenos alimentarios. Mouecoucou y col. (2004) vieron como la presencia de P de bajo grado de ME, G y X reducían la digestibilidad *in vitro* y la unión a IgE de la proteína de cacahuete, hecho que atribuyeron a la formación de complejos entre los productos de hidrólisis del cacahuete y los polisacáridos. Mouecoucou y col. (2007) describieron resultados similares en la β -lactoglobulina de la leche. En la misma línea, recientemente se ha publicado que la P ejerce un efecto protector en la digestión de alérgenos de kiwi, cereza, plátano y manzana, atribuyéndose a su capacidad gelificadora que, al formar geles en el ambiente ácido del estómago, podría disminuir la accesibilidad de las enzimas a la proteína dificultando la pérdida de epítomos durante el proceso digestivo (Polovic y col., 2009). Con estos precedentes, no se puede descartar que en preparados alimentarios en los que coexisten proteínas de huevo y polisacáridos, o incluso al ingerirlos durante la misma comida procedentes de diversos alimentos, se vea afectada la estabilidad de los alérgenos mayoritarios del huevo en el tracto digestivo y, por ende, su capacidad de desencadenar una respuesta inmune.

3.2 Interacción con lípidos: emulsiones

Las emulsiones son sistemas compuestos por dos fases inmiscibles (normalmente agua y aceite) una de las cuales, llamada “fase dispersa”, se encuentra dispersa en forma de pequeñas gotas esféricas en la otra fase, denominada “fase continua”. El proceso por el cual los dos líquidos inmiscibles pasan a formar una emulsión se conoce como homogeneización. Las emulsiones alimentarias presentan un diámetro de gota de la fase dispersa que va de 0,1 hasta 100 μm (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson 1992) y pueden ser clasificadas de acuerdo a la distribución de la fase acuosa y oleosa; por tanto, un sistema basado en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se conoce como emulsión de agua en aceite W/O (del inglés, *water in oil*), mientras que un sistema en el que hay gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión de aceite en agua o emulsión O/W (del inglés *oil in water*), estando la presente tesis doctoral centrada en las emulsiones O/W por ser de mayor relevancia en el campo que nos ocupa.

En la industria alimentaria este proceso se suele llevar a cabo utilizando dispositivos mecánicos denominados homogeneizadores, que someten a los líquidos a una intensa agitación mecánica. Aunque las emulsiones sean sistemas termodinámicamente inestables es posible formar emulsiones cinéticamente estables durante un periodo de tiempo razonable (días, semanas, meses e inclusive años) mediante la inclusión de sustancias emulsionantes antes de la homogeneización, aunque también son utilizadas a tal efecto sustancias espesantes. Las sustancias emulsionantes más comunes en la industria alimentaria son proteínas anfifílicas, tensioactivos de bajo peso molecular y fosfolípidos, mientras que los agentes espesantes habituales son los polisacáridos. La formación de una emulsión se puede describir como un proceso que comienza con la división de la futura fase dispersa en gotas, continúa con la adsorción de las moléculas de la sustancia emulsionante en la superficie interfacial recién creada y finaliza con la rotura de las gotas en otras de menor tamaño (Halling, 1981).

La resistencia de las emulsiones alimentarias frente a estos mecanismos conservando sus propiedades a lo largo del tiempo se conoce como estabilidad. La estabilidad es una propiedad crucial en las dispersiones alimentarias ya que la percepción del consumidor de la calidad del producto está claramente afectada por la apariencia. En aras de aumentar la estabilidad de la emulsión, el uso de emulsionantes como las proteínas es esencial, ya que éstas generan una serie de interacciones repulsivas (por ejemplo estéricas y electrostáticas) entre las gotas de aceite, y también facilitan la disrupción de las gotas de aceite al disminuir la tensión interfacial, retardan la

coalescencia de las gotas de aceite formando una membrana interfacial, que es resistente a la rotura, alrededor de las gotas de aceite emulsionadas, y se adsorben a las superficies de las gotas de aceite formadas durante la homogeneización de las mezclas aceite, agua y proteínas (McClements, 2004; Malaki-Nik y col., 2011). La película formada es usualmente de carácter anisotrópico y sus propiedades viscoelásticas determinan la resistencia de la emulsión frente a la coalescencia.

Un amplio rango de productos alimentarios se compone de emulsiones O/W llámense mayonesa, leche, crema, sopa y salsa, entre otros (Girard y col., 2002). Las emulsiones alimentarias, al ser sistemas termodinámicamente inestables, tienden a desestabilizarse por diversos mecanismos como la separación gravitacional o cremado que es debida a la diferencia de densidades entre la fase dispersa y la continua; la floculación, que ocurre cuando dos o más gotas se agregan pero mantienen su integridad individual; la coalescencia, que es la unión dos o más gotas de líquido para formar una única gota de mayor tamaño; la maduración de Ostwald, cuando gotas de mayor tamaño crecen a expensas de otras más pequeñas por el transporte de masa de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua; y la inversión de fases, cuando el sistema se invierte y la emulsión O/W pasa a ser una emulsión W/O (Taylor, 1995; McClements, 1999).

Los dos pasos críticos en la emulsificación son la ruptura de las gotas de la fase dispersa y su coalescencia, ambas favorecidas por la agitación intensa. La mayoría de los factores del proceso de emulsificación están relacionados con tales aspectos, especialmente con el tamaño de gota, que interesa que sea lo menor posible (McClements, 1999). A tal propósito contribuyen el tipo de emulsificador, que también afecta la eficiencia de ruptura; el uso de emulsionantes, que favorece la rotura de las gotas y conduce, generalmente, a un descenso del tamaño de gota de las emulsiones y previene la recoalescencia de las gotas; la composición y propiedades fisicoquímicas de las fases, el volumen de la fase dispersa; la energía aplicada, la temperatura y tiempo de emulsificación así como el protocolo de emulsificación (Halling, 1981; Braginsky y Belevitskaya, 1996; McClements, 1999).

3.2.1 Efecto de la interacción con lípidos en la alergenidad

El huevo en su conjunto, así como sus constituyentes (yema y clara), es un ingrediente clave en muchos productos alimentarios de bollería y pastelería, y en la elaboración de mayonesas, salsas y alimentos precocinados. La preparación de salsas con

estabilidad físico-química a largo plazo depende de la presencia de yema de huevo en el sistema. Aunque la yema es un excelente emulsionante, en numerosas ocasiones se usa el huevo entero para la preparación de salsas ya que la clara de huevo, al igual que la yema, está compuesta por proteínas de elevado valor biológico y no exenta de propiedades funcionales (Mine, 1995). Además, la yema de huevo comercial se encuentra contaminada frecuentemente con albumen (Drakos y Kiosseoglou, 2008).

El efecto de algunos tipos de procesado sobre el huevo, en términos de digestibilidad y alergenicidad, ha sido objeto de estudio, sin embargo, es difícil encontrar en la literatura estudios focalizados en la emulsificación de alérgenos de huevo aunque tales efectos se hayan estudiado en otros alérgenos alimentarios obteniéndose resultados relevantes. Por ejemplo, se ha sugerido que el proceso de emulsificación podría conllevar un aumento en la alergenicidad del cacahuete (Sicherer y Sampson, 2007) ya que en regiones como USA y Canadá, donde es habitual el consumo de crema de cacahuete, ha aumentado la prevalencia de alergia a cacahuete en los últimos años. El aumento o descenso de la alergenicidad, como resultado de la interacción del alérgeno con lípidos, puede atribuirse a que la interacción proteja al alérgeno de las condiciones gastrointestinales (Teuber, 2002); este es el caso de la β -lactoglobulina y la β -caseína de la leche, que al estar emulsionadas se digieren *in vitro* con mayor facilidad, aunque algunos de los fragmentos peptídicos formados se vieran protegidos en el caso de la β -caseína (Macierzanka y col., 2009). La α -lactoalbúmina de la leche también se digiere gástricamente menos cuando interacciona con fosfatidilcolina (PC), que es el fosfolípido más abundante de la yema de huevo, además de ser secretado por el estómago, siendo tal efecto atribuido a la inclusión de la proteína en las vesículas de PC (Moreno y col., 2005). También se ha apuntado que las fracciones lipídicas podrían modificar el transporte y/o reconocimiento del alérgeno con el subsiguiente efecto sobre la respuesta inmune (Teuber, 2002), de hecho, se ha descrito que los surfactantes de grado alimentario pueden aumentar el transporte paracelular de alérgenos alimentarios como ocurre con el OM (Mine y Zhang, 2003). Por tanto, la emulsificación de las proteínas de huevo, como parte de una salsa o mayonesa (formas en las que es muy habitual su consumo), podría afectar la resistencia a la digestión gastrointestinal, en base a los cambios conformacionales que sufre la proteína en la interfase, así como su absorción intestinal y, en último término, su potencial alergénico.

4. Aplicación del procesado en el desarrollo de fórmulas terapéuticas

Actualmente, a pesar de la intensa investigación encaminada a encontrar una cura efectiva y segura de las alergias alimentarias, la opción recomendada en personas alérgicas a alimentos continúa siendo la eliminación estricta de la dieta del alimento implicado y/o el uso de fármacos que alivien la sintomatología, pero tan solo se trata de medidas preventivas o paliativas mas no terapéuticas. Además, en algunos casos, debido a la ubiquidad de algunos alimentos, es complicado no estar expuesto a los mismos—como es el caso del huevo— a la par de que algunos estudios apuntan que evitar estrictamente el alimento incuo podría resultar en un aumento de la sensibilidad al mismo (Sicherer y col., 2001; Allen y col., 2007).

La búsqueda de una cura para las alergias alimentarias es centenaria (Schofield, 1908), sin embargo, la creciente comprensión de los mecanismos subyacentes de la alergia a alimentos, así como la caracterización de alérgenos alimentarios, ha favorecido el desarrollo de diferentes opciones terapéuticas. A la hora de valorar las opciones terapéuticas existentes es importante diferenciar los términos “desensibilización” y “tolerancia”, entendiéndose que la desensibilización es una reducción significativa de la respuesta alérgica al alimento desencadenante, mientras que la tolerancia implica la ausencia total de respuesta alérgica tras la exposición al alérgeno causante de la misma.

4.1 Aproximaciones terapéuticas: inmunoterapia oral

Comúnmente, las estrategias terapéuticas se clasifican en tratamientos específicos del alérgeno, como pueden ser la inmunoterapia oral (OIT), inmunoterapia sublingual e inmunoterapia epicutánea, ya sea empleando alérgenos en su forma nativa o alérgenos recombinantes y/o modificados, y en tratamientos no específicos del alérgeno, que incluyen el uso de anticuerpos monoclonales anti-IgE y anti IL-5, preparados de hierbas chinas, terapia con citoquinas, uso de bacterias probióticas y uso de antagonistas de receptores “toll like”, entre otros (Nowak-Wegrzyn y Sampson, 2011). Dentro de esta plétora de posibilidades la OIT es la opción más estudiada para tratar la alergia a alimentos por los resultados tan prometedores que se han descrito, además de ser una de las más antiguas (Mine y Yang, 2008).

La OIT consiste en administrar el alimento o ingrediente ofensivo en dosis que van aumentando gradualmente para desensibilizar al individuo y finalmente inducir tolerancia oral. Alcanzar la desensibilización, como indicábamos con anterioridad, no significa la cura total y la protección alcanzada va depender de la ingesta regular del

alimento ofensivo, mas si ésta es interrumpida el efecto protector podría perderse o reducirse notablemente. Alcanzar la tolerancia oral implica el desarrollo de células T-reg y la reducción de la respuesta pro-alérgica Th-2 seguida finalmente de un estado de anergia, estando el paciente completamente curado (Uermosi y col., 2010). La fase de escalado generalmente se da en un ambiente controlado para mayor seguridad el paciente pero, una vez alcanzada la desensibilización, la fase de mantenimiento se suele hacer sin supervisión médica. Basándonos en los estudios publicados hasta la fecha existen distintos patrones de respuesta a la OIT y quedan interrogantes que es necesario resolver antes de que la OIT sea empleada más allá del ámbito experimental (Nowak-Wegrzyn y Sampson, 2011) (**Figura 6**).



Figura 6. Cuestiones pendientes de resolver relativas a la OIT.

Por ejemplo, a pesar de los resultados esperanzadores que se han obtenido, son pocos los estudios que han establecido la reactividad inicial del paciente, lo que haría prever una terapia exitosa, o que han incluido un grupo placebo control. Normalmente, alrededor de un 10-20% de los pacientes no consigue alcanzar la desensibilización durante el periodo inicial y abandona los protocolos debido a la aparición de reacciones alérgicas notorias. En torno a un 10-20% son incapaces de completar la fase de mantenimiento alcanzando únicamente una desensibilización parcial. Por tanto, un 50-75% de los pacientes consiguen alcanzar y tolerar la dosis de mantenimiento. La mayoría de los niños toleran más de 5g del alimento alérgico durante la terapia, pero es

necesario identificar marcadores que contribuyan a determinar si la desensibilización parcial desembocará en tolerancia alargando la OIT. También se desconoce si el fracaso en la desensibilización está asociado con un fenotipo más severo y permanente de alergia a alimentos, en contraposición con los casos donde se induce la tolerancia oral de forma espontánea, que están asociados con un fenotipo clínico de alergia pasajera con más probabilidades de resolver la alergia alimentaria. Además, aunque hay algunos indicadores inmunológicos asociados con una inmunoterapia oral exitosa, como son una reducción de los anticuerpos específicos IgE, la inducción de IgG4/IgG2a específica, aumento de la respuesta Th-1 con disminución de la Th-2 y desarrollo de un estado de anergia en células T (Burks y col., 2008), los mecanismos inmunológicos que llevan a la cura no se conocen del todo y quedan dudas por resolver, verbigracia el papel que ejercen los anticuerpos IgA específicos en la mucosa gastrointestinal (Fagarasan y col., 2010) o el controvertido papel de las IgG específicas y las distintas clases de isotipos en la respuesta alérgica (Uermosi y col., 2010).

4.2 Inmunoterapia oral para alérgicos a huevo

La aplicación del procesado de alimentos en la preparación de fórmulas para OIT es una realidad palpable y asaz frecuente en pacientes alérgicos a huevo. Actualmente, la opción más valorada es la elaboración de preparados que contengan huevo tratado térmicamente (**Figura 7**). Como se ha mencionado, el calentamiento intenso del huevo disminuye la alergenidad debido a la rotura de epítomos conformacionales, que afecta a aquellos alérgenos de huevo termolábiles que contengan epítomos espaciales en su estructura, como es el caso de la OVA. A partir del procesado térmico del huevo se pueden obtener fórmulas relativamente seguras para OIT y con poder terapéutico. De este modo, Urisu y col. (1997) vieron que la mitad de los pacientes alérgicos a huevo toleraron clara de huevo calentada a 90°C durante 60 minutos y Lemon-Mule y col. (2008) comprobaron que el 74% (87) de los pacientes toleraron la ingesta de huevo calentado como ingrediente de un bollo (175°C, 30 min) o un gofre (260°C 3 min). Resulta interesante el hecho de que, aunque se trate de estudios distintos, más pacientes tolerasen el huevo calentado que la clara calentada, lo que puede ser atribuido a que el potencial alérgico del huevo se halla mayormente concentrado en la clara. Además, mientras que la OVA, OT y LYS son termolábiles, lo cual no quita para que contengan epítomos secuenciales en su estructura que resistan el tratamiento térmico, el OM es termoestable y reconocido como inmunodominante. Siguiendo esta línea, Urisu y col. (1997) fueron

pioneros en la elaboración de una fórmula de OIT para alérgicos a huevo basada en huevo calentado con bajo contenido en OM, siendo tal preparado tolerado por un 95% de los pacientes. Este preparado hipoalérgico ha demostrado tener propiedades terapéuticas; recientemente se ha visto que un 48% (28) y un 44% (24) de pacientes alérgicos a huevo fueron desensibilizados tras un mes o dos respectivamente de OIT (Urisu y col., 2008; Urisu y col., 2010).

La utilización de clara de huevo calentada con bajo contenido en OM, así como otros preparados de huevo calentado, están siendo objeto de estudio (**Figura 7**) para ser empleados en la OIT de pacientes alérgicos a huevo, sin embargo, como señalábamos antes, es necesario profundizar en los mecanismos inmunológicos involucrados en la OIT antes de poner a punto los protocolos de OIT y que estos puedan ser aplicados de forma rutinaria. Para tal menester, a parte de estudios clínicos, la utilización de modelos animales, como los roedores, son de gran ayuda. El uso de ratones ofrece numerosas ventajas por la posibilidad de intervención en las distintas cepas (transgénicos, *knock-out*, etc.), pequeño tamaño, fácil manejo, elevado índice de natalidad, gran diversidad genética y la existencia de modelos optimizados para el estudio de la respuesta alérgica tardía, inmediata, rinitis, anafilaxis, etc., ofreciendo un abanico de posibilidades experimentales que de cualquier modo sería inviable en humanos (Zubeldia, 2001).

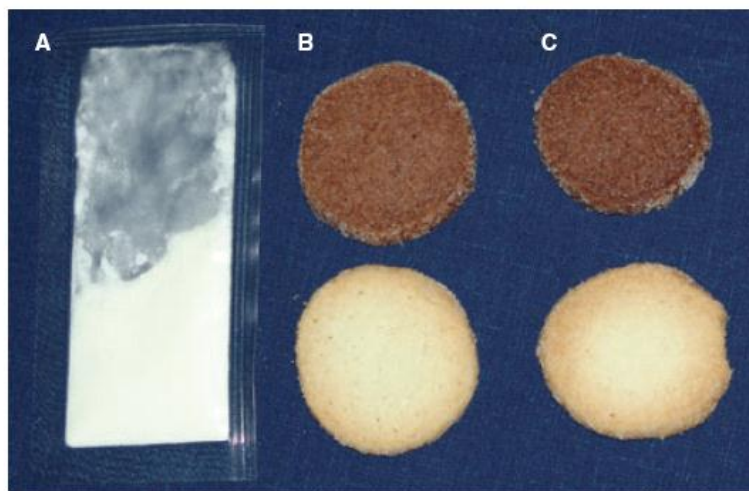


Figura 7. Preparados habituales para OIT en alérgicos a huevo: a) liofilizado de clara de huevo; b) galleta de huevo calentado con bajo contenido en OM; c) galleta de clara de huevo calentada. Tomado de Benhamou y col. (2010)

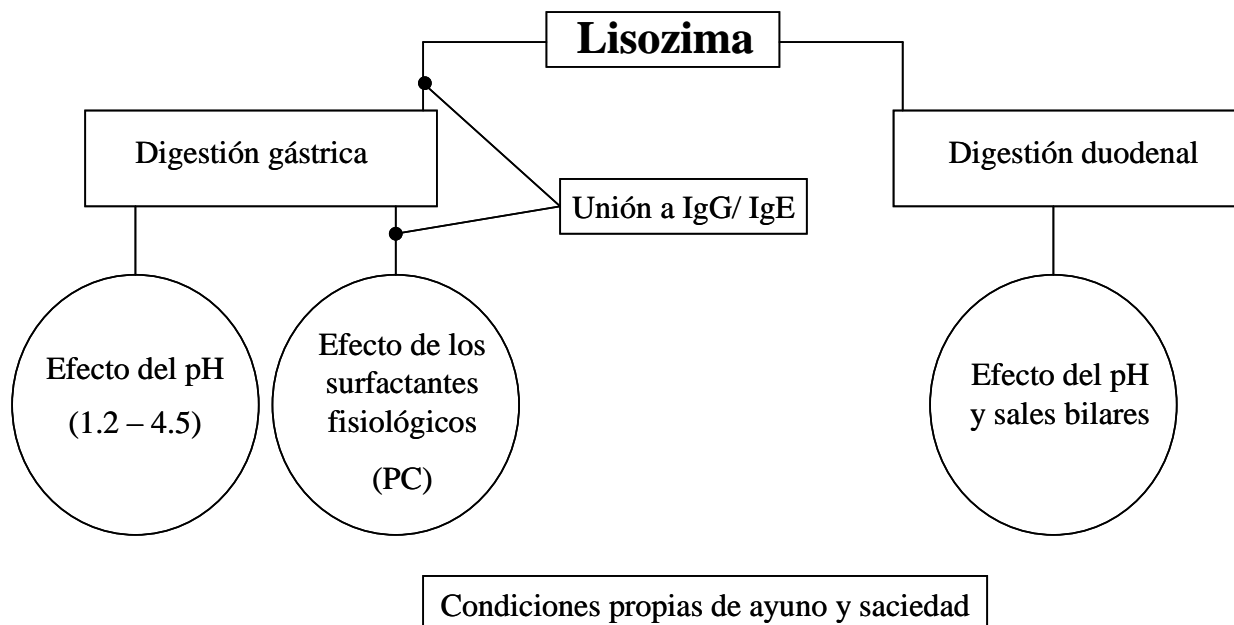
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Actualmente, a pesar de los avances en inmunología y de que la inmunoterapia oral está convirtiéndose en una alternativa sólida para tratar las alergias alimentarias, la opción comúnmente recomendada y más segura, en personas alérgicas a alimentos, es eliminar de la dieta el alimento desencadenante. No obstante, en el caso de la alergia al huevo, es tarea ardua dada la omnipresencia de compuestos derivados del huevo en productos cocinados o manufacturados, lo que frecuentemente da lugar a exposiciones inadvertidas, que pueden tornarse peligrosas si se desencadenan respuestas anafilácticas.

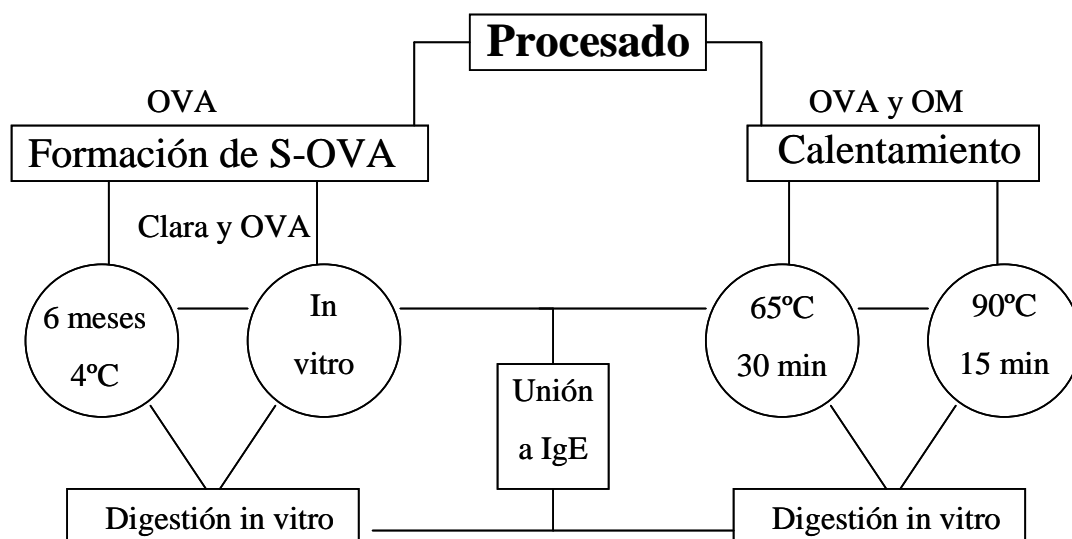
La alergenidad depende en gran medida, pero no exclusivamente, de la resistencia de los alérgenos al procesado y a las enzimas digestivas, consiguiendo llegar intactos al intestino. Dicha resistencia se atribuye a varios factores, entre los que destaca la estructura del propio alérgeno, su flexibilidad y la accesibilidad de los lugares de acción de las enzimas, que puede sufrir modificaciones durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos. Además se ha demostrado que aspectos tales como la absorción a interfases o la presencia de surfactantes fisiológicos durante la digestión pueden jugar un papel fundamental en la digestibilidad y en la inmunogenicidad de algunas proteínas. La comprensión de las propiedades de las proteínas alergénicas exige tener en cuenta la diversidad de ingredientes y operaciones que se emplean en tecnología de alimentos, así como la complejidad de los procesos digestivos. En la investigación sobre alergias alimentarias, la mayoría de los trabajos se centran en proteínas puras, pero un aspecto crucial es la forma en que estas proteínas se digieren como parte de matrices complejas.

La LYS es una ovoproteína ampliamente utilizada debido a su potente actividad antibacteriana. No obstante, se sabe poco sobre su comportamiento en condiciones gastrointestinales, o sobre la alergenidad remanente de los digeridos, encontrándose incluso resultados contradictorios en la bibliografía. Aun no siendo considerada tan alergénica como la OVA o el OM, su amplio uso en preparados farmacológicos y alimentos hace interesante su estudio empleando sistemas de digestión *in vitro* que reproduzcan condiciones fisiológicas. Por lo tanto, nuestro **primer objetivo fue investigar el comportamiento de la LYS bajo diferentes condiciones gastrointestinales experimentales y evaluar la alergenidad *in vitro* de los digeridos**, siguiendo el plan de trabajo ilustrado en el esquema 1.



Esquema 1. Plan de trabajo seguido para investigar el comportamiento de la LYS bajo diferentes condiciones gastrointestinales experimentales, que se dan en estados de ayuno, saciedad o en estados intermedios, y evaluar la alergenicidad *in vitro* de los digeridos.

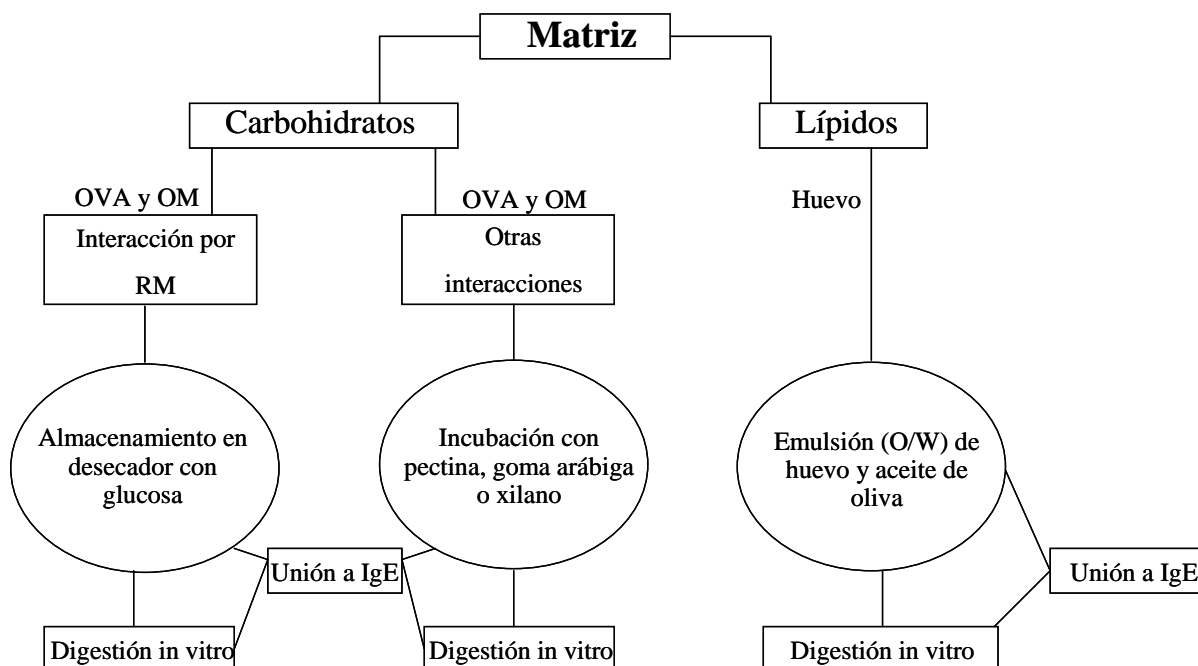
El almacenamiento de los alimentos hasta su consumo puede dar lugar a modificaciones estructurales. Este es el caso de la OVA que, con el tiempo, se transforma una forma más termoestable, llamada S-OVA. Aunque la S-OVA ha sido investigada, su estudio se ha abordado generalmente desde una perspectiva industrial relacionada con la pérdida de las propiedades funcionales del huevo, sin haberse evaluado su digestibilidad y alergenicidad. Por otra parte, el tratamiento térmico, parte habitual del procesado, puede inferir cambios estructurales importantes en las proteínas, como desdoblamiento o agregación, que podrían afectar tanto a su digestibilidad como a su capacidad de desencadenar una respuesta alérgica. Por ejemplo, el calentamiento puede provocar entrecruzamientos covalentes en la estructura, estabilizándola y haciéndola más resistente al proceso digestivo, o desdoblar la proteína y que se vea facilitada la acción de las enzimas digestivas. Aunque el efecto del tratamiento térmico en proteínas de huevo ha sido objeto de estudio, no siempre se ha evaluado cómo afectaba éste a la digestibilidad de las proteínas y/o a la alergenicidad de los digeridos. Basándonos en estas evidencias planteamos el **segundo objetivo: estudiar el efecto del almacenamiento, en concreto la formación de S-OVA, así como el del tratamiento térmico de la OVA y el OM, sobre su digestibilidad y alergenicidad *in vitro***, siguiendo el plan de trabajo ilustrado en el esquema 2.



Esquema 2. Plan de trabajo seguido para estudiar el efecto del almacenamiento y procesamiento (formación de la S-OVA y tratamiento térmico de la OVA y el OM) sobre su digestibilidad y alergenicidad *in vitro*.

La incorporación de proteínas en estructuras coloidales, tales como geles, espumas o emulsiones y, en general, las interacciones que puedan darse entre los alérgenos y otros componentes que se hallen en la matriz en la que son consumidos, o que se ingieran conjuntamente con ellos, pueden modificar la forma en la que son digeridos y la inmunorreactividad de los mismos. Las interacciones más frecuentes de proteínas con otros componentes de la matriz se dan con carbohidratos y lípidos. La glicosilación, vía RM, ocurre entre azúcares reductores, y la clara de huevo contiene hasta un 4% de glucosa respecto al contenido en sólidos, y proteínas susceptibles con grupos amino libres. También pueden darse interacciones no covalentes entre proteínas y carbohidratos. Por ejemplo, el uso frecuente de polisacáridos, como P, G o X en la industria alimentaria, hace factible que interaccionen electrostáticamente o mediante puentes de hidrógeno con alérgenos de huevo, ya sea en los alimentos que contienen ambos o durante la digestión. Además de las interacciones con carbohidratos, es reseñable la interacción con lípidos, dado que el huevo es frecuentemente consumido en una matriz lipídica, como puede ser una mayonesa o salsa. La adsorción de proteínas a las interfases puede limitar la exposición de la porción adsorbida a las enzimas digestivas aunque, de modo general, el aumento de flexibilidad que caracteriza a la adsorción aumenta la proteólisis. Si bien existen muchos estudios referidos a emulsiones de huevo, la gran mayoría se centran en sus propiedades tecnológicas, sin

explorar el comportamiento de tales emulsiones en cuanto a digestibilidad y alergenicidad. Por tanto, el **tercer objetivo fue investigar el efecto de la matriz, ya sea rica en carbohidratos (glucosa o polisacáridos) o en lípidos (emulsión O/W) sobre la digestión de alérgenos de huevo y la alergenicidad *in vitro* de los digeridos resultantes**, de acuerdo al plan de trabajo detallado a continuación (esquema 3):



Esquema 3. Plan de trabajo seguido para investigar cómo influyen las interacciones con algunos componentes de la matriz alimentaria en la digestibilidad y alergenicidad *in vitro* de alérgenos de huevo.

La utilización de fórmulas de huevo procesado para OIT en pacientes alérgicos a huevo es habitual, destacando el preparado de clara de huevo calentada con bajo contenido en OM porque, además de tener propiedades inmunoterapéuticas, es hipoalergénico. No obstante, los mecanismos implicados en la desensibilización e inducción de tolerancia oral no se conocen completamente, siendo necesario profundizar en ellos, así como identificar marcadores que permitan evaluar los efectos terapéuticos asociados con el avance de la OIT. Con tales precedentes, el **cuarto objetivo fue investigar los mecanismos inmunomoduladores mediante los cuales ejerce su efecto una fórmula de clara de huevo procesada (tratada térmicamente y con bajo contenido en OM) en un modelo de ratón alérgico a huevo**, siguiendo el plan de trabajo reflejado en el esquema 4.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados obtenidos, tanto publicados como en vías de publicación, son los siguientes:

1. Jiménez-Saiz R, Martos G, Carrillo W, López-Fandiño, Molina E. Susceptibility of lysozyme to *in-vitro* digestion and immunoreactivity of its digests (2011). *Food Chemistry* 127: 1719-1726.
2. Jiménez-Saiz R, Pineda-Vadillo C, López-Fandiño R, Molina E. Human-IgE binding and *in vitro* digestion of S-OVA. *Food Chemistry* (Enviado).
3. Jiménez-Saiz R, Belloque J, Molina E, López-Fandiño R (2011). Human immunoglobulin (Ig) E binding to heated and glycated ovalbumin and ovomucoid before and after *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10044-10051.
4. Jiménez-Saiz R, López-Expósito I, Molina E, López-Fandiño R. Intestinal stability of egg allergens in the presence of polysaccharides. *Food Hydrocolloids* (Enviado).
5. Jiménez-Saiz R, Ruíz-Henestrosa VMP, López-Fandiño R, Molina E. *In vitro* digestibility and allergenicity of emulsified hen egg. *Food Research International* (Enviado).
6. Jiménez-Saiz R, Rupa P, Mine Y. Immunomodulatory effects of heated ovomucoid-depleted egg white in a Balb/c mouse model of egg allergy (2011). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 13195-13202.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

1. Digestión de la lisozima

La escasa bibliografía existente, y en ocasiones contradictoria, sobre la digestibilidad de la LYS y la alergenicidad remanente de los digeridos, nos llevó a estudiar el comportamiento de la LYS, bajo diferentes condiciones que imitasen la digestión fisiológica, lo cuál requirió de la puesta a punto y optimización en nuestro laboratorio de un sistema de digestión *in vitro* que simulase la digestión gástrica sucedida de la duodenal (Moreno y col., 2005; Martos y col., 2010). Con dicho modelo, se evaluó la influencia del pH, desde valores bajos, habituales en ayunas (1.2-2), a más elevados, que ocurren con el estómago lleno o son característicos en niños (3.2-4-5). La LYS se digirió únicamente a pH 1.2 y 2, dando lugar a fragmentos peptídicos menores de 6 kDa que resistieron la acción de la pepsina al menos durante 2 horas. La digestión fue mayor a pH 1.2, no pudiéndose detectar, por SDS-PAGE, LYS intacta tras 60 min de hidrólisis. El pH óptimo al que actúa la pepsina es amplio y se ha visto que, dentro del rango de pH en el que la pepsina es activa, su acción depende en gran medida de los cambios conformacionales que sufran las proteínas como consecuencia del pH (Schlamowitz y Peterson, 1959). A un pH estomacal muy ácido, típico de adultos en ayunas (1.2-2), la digestibilidad de la LYS se puede relacionar con el desdoblamiento de la LYS (De Laureto y col., 2002). Así pues, la pepsina, que requiere la unión y acoplamiento de secuencias extendidas de 8-10 aminoácidos con su centro activo para actuar (Fontana y col., 1986), podrá digerir mejor aquellas formas proteicas que se hallen desdobladas. En cambio, con una acidez menor, como la que se da en estados de saciedad o en los recién nacidos, se redujo el grado de hidrólisis de LYS, e incluso se impidió la digestión. El limitado grado de digestión de LYS a pH igual o superior a 3.2, podría ser de especial interés en bebés menores de 2 meses, cuyo pH estomacal es particularmente alto, ya que favorecería la llegada de LYS al duodeno, donde podría ejercer un papel antimicrobiano, pero también alcanzar el sistema inmune con facilidad debido a la mayor permeabilidad que caracteriza los estados de inmadurez intestinal (Vukavic, 1984).

Los resultados obtenidos pueden ayudar a comprender las discrepancias existentes sobre la resistencia de la LYS a la acción de la pepsina, que probablemente tengan su origen en la heterogeneidad de condiciones experimentales empleadas en los

estudios, como son el pH del medio gástrico o la relación enzima:sustrato (E:S)—que convendría expresar, para facilitar la comparación, en unidades de enzima por miligramo de proteína. Verbigracia, De Laureto y col. (2002) han descrito la gran estabilidad de LYS a la digestión péptica empleando una relación E:S (p/p) de 1:500, a pH 2 y 20-20°C; Ibrahim y col. (2005) publicaron que el 40% de la LYS se digiere tras 120 min de digestión a pH 4, empleando un ratio E:S (p/p) de 1:50, mientras que Mine y col. (2004) vieron que se digería completamente a pH 1 tras 60 min de hidrólisis empleando un ratio de E:S (p/p) de 1:25. Con estos precedentes parece necesaria la estandarización de los métodos de digestión *in vitro*, de modo que éstos reproduzcan condiciones relevantes fisiológicamente, para poder evaluar de forma fidedigna y reproducible el comportamiento de los alérgenos a través del sistema digestivo (Moreno, 2007). En términos metodológicos, el próximo reto que ha de afrontarse es el empleo de digestores dinámicos, que además de un mayor grado de precisión, puedan reproducir mejor, desde un punto de vista físico, las transformaciones que sufre el alimento a través del tracto gastrointestinal (masticación, vaciado gástrico, peristaltis, etc.).

También se evaluó la influencia de surfactantes naturales, como la PC y las sales biliares, en diferentes concentraciones características de estados de ayuno y de saciedad, sobre la digestibilidad de LYS. La PC protegió levemente a la LYS de la acción de la pepsina, aunque no cambió el patrón de hidrólisis. Un comportamiento parejo se ha descrito para otras proteínas alimentarias, como la α -lactoalbúmina, donde la mayor resistencia a la digestión en presencia de PC se explicó por la penetración parcial de la proteína en las vesículas de PC (Moreno y col., 2005). En cambio, la presencia de PC no afectó la digestión péptica de otros alérgenos alimentarios como la albúmina 2 S de la nuez de Brasil (Moreno y col., 2005), la β -lactoglobulina (Macierzanka y col., 2009) o la OVA (Martos y col., 2010). El hecho de que la presencia de PC disminuyese la digestión de LYS era esperable, puesto que algunas de las propiedades biológicas de la LYS, como la antimicrobiana y la inmunomoduladora, se han atribuido a su capacidad de penetrar en las bicapas lipídicas (Gorbenko y col., 2007). En concordancia con tales resultados, vimos que, al mezclar la LYS con PC, aumentaba la hidrofobicidad de la LYS, posiblemente por la unión de ésta con la PC. Por tanto, la LYS podría interaccionar con fosfolípidos zwitteriónicos, como la PC, mediante interacciones polares o hidrófobas que produjesen la asociación de LYS con las vesículas de PC, de

hecho, se ha descrito que la LYS podría quedar atrapada en liposomas no cargados de PC (Witoonsaridsilp y col., 2010).

El comportamiento de LYS en medio intestinal estuvo marcado por la presencia de sales biliares, que indujeron su precipitación, especialmente en condiciones experimentales que imitaban un estado intestinal de saciedad, que es cuando más cantidad de sales biliares se segrega (Kostewicz y col., 2002), aunque la PC evitó parcialmente la precipitación de LYS. Es probable que la LYS interaccione con las sales biliares mediante atracciones electrostáticas entre la proteína, fuertemente catiónica y las moléculas aniónicas de las sales. Por otra parte, de acuerdo con Gass y col. (2007), en presencia de PC o de otros lípidos, los ácidos biliares tienden a formar parte de micelas mixtas a nivel duodenal, lo que disminuiría la concentración de ácidos biliares libres capaces de interaccionar con las proteínas.

La precipitación de la LYS en condiciones de elevada concentración de sales biliares y bajo pH, podría explicar el hecho de que la administración oral de LYS con fines farmacológicos en humanos proporcione mayor absorción en ayunas, que cuando se toma junto con otros alimentos (Hashida y col., 2002). En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que cuando se consume huevo entero, las lipoproteínas de baja densidad y la PC, presentes en la yema, son capaces de unirse a las sales biliares, lo que dejaría, de modo natural, menos concentración disponible para inducir la agregación de la LYS. Experimentos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que cuando se simula la digestión gastrointestinal de huevo entero, la LYS permanece soluble bajo condiciones duodenales y resiste a la acción de las proteinasas pancreáticas (resultados no publicados).

Dado que la solubilidad de la LYS en condiciones duodenales se vio dramáticamente reducida, únicamente se midió la capacidad de unión a IgE de los digeridos gástricos de LYS. Para ello fue necesaria la optimización del método de ELISA de inhibición, también llamado de competición, con sueros de pacientes alérgicos, que fue compleja por el limitado volumen de sueros disponible y la baja señal que se detectaba, lo cual solucionamos incluyendo un paso de amplificación de la señal que mejoró ostensiblemente la detección y permitió un mejor aprovechamiento de los sueros al poder diluirlos. La ventaja principal de este método reside en preincubar la muestra problema (por ejemplo, un digerido gástrico de LYS) con sueros de pacientes alérgicos a huevo, antes de ser añadida a la placa, dándose un contacto íntimo entre los epítopos contenidos en la muestra y la IgE sérica, que evita la pérdida de pequeños

fragmentos peptídicos que difícilmente se adherirían a la placa, estimándose con mayor precisión la alergenicidad *in vitro*. La otra ventaja de este tipo de ELISA es que, al hacer diluciones seriadas de la muestra problema, se obtiene una curva sigmoidal dosis-respuesta, de pendiente variable, que permite calcular el IC50, es decir, la cantidad de proteína que une o inhibe el 50% de la IgE, y de este modo valorar la alergenicidad *in vitro* de las muestras que nos interesen.

Este sistema de ELISA reveló que durante la digestión gástrica de LYS, en presencia y ausencia de PC, se liberaban fragmentos proteicos con gran capacidad de unión a IgG e IgE equiparable o superior a la de la proteína nativa y que podrían ser responsables de su elevada alergenicidad. La unión a IgG e IgE fue mayor en los digeridos gástricos en presencia de PC, hecho que se puede achacar al efecto protector de la PC sobre la digestión de LYS, aunque tal resultado no fue significativo. Así pues, la precipitación de LYS en condiciones intestinales (intermedias y de saciedad) podría facilitar la llegada de la proteína a partes inferiores del intestino donde podría ejercer un papel defensivo, aunque la precipitación podría también afectar la cantidad de proteína inmunorreactiva intacta que podría ser absorbida.

2. Efecto del procesado sobre alérgenos de huevo

2.1 Ovoalbúmina

Durante el almacenamiento pueden ocurrir cambios estructurales en las proteínas, siendo este el caso de la OVA que, de modo natural durante el envejecimiento del huevo, se transforma en S-OVA y causa una merma en sus propiedades funcionales, no estando descrito cómo tales cambios afectan a su digestibilidad y potencial alergénico, cuyo estudio abordamos. Se observó que en las muestras de OVA y clara en las que se indujo la formación de S-OVA *in vitro*, la reactividad frente a IgE fue significativamente menor, hecho que en parte puede asociarse con algunos de los cambios estructurales descritos en la S-OVA y, en particular, con aquellos que afectan a Ser 164, Ser 320 y Phe 99, pues estos aminoácidos están presentes en regiones de la proteína en las que se han identificado epítomos (Kahlert y col., 1992). Además, el cambio conformacional que sufre Phe 99 induce una disminución en la accesibilidad al solvente de los aminoácidos adyacentes, entre los que se incluye Phe 378, un residuo que forma parte de un epítomo de la OVA localizado en una posición muy accesible en la superficie de la proteína (Honma y col., 1996). Por otra parte, el aumento de lámina β antiparalela en detrimento de hélice α que se da en la S-OVA (Kint y Tomimatsu, 1979)

es indicativo de una desnaturalización parcial durante el tratamiento alcalino, que pudo haber contribuido a la pérdida de epítomos conformacionales.

Observamos, sin embargo, que la S-OVA era más resistente a la digestión que la OVA nativa, posiblemente porque los cambios anteriormente descritos la dotan de mayor estabilidad, solidez e hidrofobicidad (Huntington y Stain, 2001). La mayor resistencia de la S-OVA fue particularmente evidente durante la digestión gástrica simulada, mientras que las diferencias en cuanto a la susceptibilidad frente a la proteólisis de OVA y S-OVA se atenuaron durante la digestión duodenal. Por ello, y a pesar de las diferencias mencionadas, los hidrolizados gastroduodenales de S-OVA mostraron una baja reactividad frente a IgE, similar a la de la OVA. Esto puede deberse a la similitud entre los patrones de fragmentación de ambas y a que, dada la virtual desaparición de la proteína intacta, son los productos de digestión los principales responsables de la pequeña reactividad residual frente a IgE.

Es sabido que el tratamiento térmico provoca cambios fisicoquímicos en las proteínas dependiendo de la naturaleza de éstas y de las condiciones del calentamiento (Wal, 2003). Los cambios fisicoquímicos inducidos en la OVA por el tratamiento térmico dieron lugar a resultados diferentes. El tratamiento térmico de la OVA afectó al patrón de separación de la proteína mediante SDS-PAGE, siendo tales cambios dependientes de la intensidad y duración del calentamiento. El calentamiento a 65°C durante 30 min causó la formación de un fragmento de OVA de peso molecular ligeramente menor, coincidente con el fragmento de 40.1 kDa que se forma por ruptura del enlace His22-Ala23 por la pepsina (Martos y col., 2010), mientras que el calentamiento a 90°C durante 15 min produjo, además de la aparición de tal fragmento, la formación de agregados de elevado peso molecular unidos por enlaces disulfuro. Asimismo, se ha descrito que la OVA calentada 3 min a 100°C se fragmenta notablemente, detectándose por SDS-PAGE como una banda menor de 14kDa (Honma y col., 1994). A tal respecto, la OVA se ha descrito como una proteína termolábil; aunque existen ciertas discrepancias en cuanto a su temperatura de desnaturalización que, dependiendo del autor, puede ir desde 75 a 84°C (Donovan y col., 1975; Hammershoj y col., 2002; de Groot y de Jongh, 2003). Es posible que la variabilidad encontrada en la bibliografía respecto a la temperatura de desnaturalización de la OVA se deba a la presencia inadvertida de S-OVA junto con la OVA nativa que, de acuerdo con estudios previos, es más estable al tratamiento térmico, hecho que pudimos corroborar en las muestras en las que inducimos formación de S-OVA *in vitro*, a partir

de OVA y clara, con temperaturas de desnaturalización de 90.3 y 91.5°C respectivamente.

Cuando se sobrepasó claramente la temperatura de desnaturalización de la OVA, con el tratamiento térmico a 90°C durante 15 min, se redujo considerablemente su capacidad de unir IgE, hecho atribuible a la pérdida de epítomos conformacionales. Se ha descrito que, en condiciones más intensas, por ejemplo 3 min a 100°C, incluso podrían perderse epítomos secuenciales debido a la intensa rotura de la proteína en la que, con seguridad, se ve afectada la estructura primaria (Honma y col., 1994). Otros estudios también han puesto de manifiesto que el calentamiento intenso de OVA reduce su capacidad de reconocer IgE, pero sin anularla por completo (Kim y col., 2002; Mine y Zhang, 2002). En cambio, cuando el tratamiento térmico no es intenso, la OVA puede pasar inalterada, verbigracia, al calentarse a 65°C durante 30 min. Existe la posibilidad de que tratamientos térmicos menos intensos, que no desnaturalicen completamente la OVA, la lleven a un estado de “molten globule” en el que esté parcialmente desdoblada sin compromiso de la estructura terciaria (Campbell y col., 2003) y que podrían incluso aumentar su alergenicidad, ya que no habría una clara pérdida de epítomos conformacionales y se expondrían parte de los escondidos en la estructura. De hecho, cuando la OVA se desnaturaliza con urea o con ácido clorhídrico, no se detectan por SDS-PAGE cambios importantes en la estructura, pero la capacidad de unión a IgE es mayor que la de la proteína nativa (Honma y col., 1994).

La OVA sometida a calentamiento intenso (90°C, 15 min) experimentó un aumento notable de su digestibilidad *in vitro*, mostrando un estado avanzado de digestión tras la fase gástrica que corrobora lo descrito por Takagi y col. (2003). Estos autores vieron un aumento de la hidrólisis de la OVA tras el calentamiento a 100°C durante 5 min, aunque emplearon un modelo experimental que evaluaba de forma independiente la digestibilidad en condiciones gástricas y duodenales, en vez de hacerlo de forma sucesiva. La digestión gástrica de OVA calentada 90°C y 15 min seguida de duodenal evidenció que la OVA quedaba totalmente hidrolizada tras la digestión duodenal, detectándose tan solo fragmentos peptídicos hidrofílicos y presumiblemente de bajo peso molecular por RP-HPLC. El calentamiento de la OVA aumentó su digestibilidad, posiblemente al facilitar el acceso de las enzimas digestivas a los puntos de corte específicos. La pérdida de epítomos conformacionales debida al tratamiento térmico, sumada a la de epítomos secuenciales por el avanzado grado de digestión, prácticamente abolió la capacidad de unión a IgE de la OVA calentada y digerida, lo

que explicaría el hecho de que un 50% de pacientes alérgicos toleren la clara de huevo calentado (Urisu y col., 1997) donde la OVA supone el 54% del contenido proteico.

2.2 Ovomucoide

El efecto del tratamiento térmico del OM sobre su digestibilidad y alergenicidad *in vitro* fue motivo de estudio. El OM no experimentó cambios detectables por SDS-PAGE o RP-HPLC tras ser calentado debido a su gran termoestabilidad. Aunque la proteína, y cada uno de sus dominios, sufran desdoblamiento por el calor, se ha visto que tales cambios son reversibles (60-90°C) (Matsuda y col., 1981). No obstante, el desplegamiento y posterior plegamiento de la proteína van a estar influenciados por diferentes factores como el pH y la fuerza iónica del medio, pudiendo resultar en que la renaturalización del OM no sea completa (Swintkruse y Robertson, 1995). En nuestro estudio, el calentamiento a 90°C y 15 min redujo su capacidad de reconocimiento por IgE, posiblemente por pérdida de epítomos conformacionales, habiéndose descrito un resultado similar al calentarlo a 95°C y 15 min (Mine y Zhang, 2002). También se ha sugerido que la renaturalización del OM tras ser tratado por calor (100°C, 30 min) podría conducir a la formación de nuevos epítomos o, al menos, de epítomos específicos de OM desnaturalizado (Hirose y col., 2004).

La digestión gastrointestinal del OM calentado fue muy similar a la del nativo. Aunque frecuentemente se habla de la exigua digestibilidad del OM (Hirose y col., 2004), éste se degrada rápidamente con pepsina (Kovacs-Nolan y col., 2000). El hecho de que el OM nativo se digiera con tal prontitud en presencia de pepsina (en 10 min en nuestro estudio) podría dificultar la comparación de su digestibilidad con la del OM calentado. La resistencia del OM a la digestión se debe a los fragmentos formados durante la digestión gástrica que fueron visibles después de la duodenal. Tal resistencia, previamente descrita en el OM nativo, también se manifestó en el OM tratado térmicamente, sin hallarse diferencias entre ambos, y podría deberse a que el OM exhibe actividad inhibidora de la tripsina que, aunque se reduce durante la digestión gástrica, puede contribuir a mantener la integridad de sus fragmentos en el duodeno (Kovacs-Nolan y col., 2000), fragmentos que mantienen una reducida, pero perceptible, capacidad de unión a IgE.

El hecho de que el OM sea reconocido como el alérgeno inmunodominante del huevo es en gran parte debido a su resistencia al calentamiento, que apenas afecta a su estructura, ya que se renaturaliza en su mayoría, y a que éste no modifica su digestibilidad cómo ocurrió, por ejemplo, con la OVA. Así, la presencia de IgE reactiva

frente a digeridos gástricos de OM se ha postulado como un indicador de alergia persistente en pacientes alérgicos a huevo (Urisu y col., 1999), aunque, puesto que el entramado inmunológico del intestino va a ser determinante en el desarrollo de la alergia, quizá sería más apropiado determinar la reactividad de IgE frente a digeridos duodenales de OM como indicador de alergia persistente a huevo. Cuando testamos la unión a IgE de los digeridos duodenales de OM, vimos que estos fueron capaces de unir IgE y que, incluso los digeridos duodenales del OM calentado reconocieron IgE de forma similar a los de OM nativo, lo que evidencia el papel inmunodominante del OM en el huevo.

3. Efecto de la matriz sobre alérgenos de huevo

3.1 Interacción con glucosa por reacción de Maillard

Los diferentes resultados existentes acerca de la influencia de la RM sobre la digestibilidad y alergenicidad de proteínas alimentarias nos impulsó a estudiarla en los alérgenos principales de la clara (OVA y OM), cuyo contenido en glucosa contribuye a que se dé la reacción. Las medidas de color y grupos amino libres fueron indicadores del avance de la RM en la OVA y el OM. Los cambios inferidos en ambas proteínas por la RM fueron dependientes del tiempo de incubación, observándose los mayores cambios tras 96 horas de glicación. A ese tiempo, en ambas proteínas se produjo polimerización, mediante enlaces disulfuro, pero también mediante enlaces covalentes no reductibles, especialmente en el caso de la OVA, hecho que había sido previamente descrito (Kato y col., 1988). Además de la agregación, por SDS-PAGE también se vio un desplazamiento de las bandas de OVA y OM hacia valores ligeramente superiores de Mr, que indicaba la unión de moléculas de glucosa a las proteínas.

La RM modificó la capacidad de unión a IgE de OVA y OM de forma opuesta. En la primera, la alergenicidad *in vitro* disminuyó, lo que hace suponer que la OVA glicada sufrió cambios que conllevaron a la rotura de epítopos conformacionales, pudiendo el elevado grado de polimerización haber enmascarado epítopos en la superficie. Esta explicación para la reducción del reconocimiento de OVA glicada por anticuerpos se ha dado recientemente en el caso de proteínas de avellana modificadas por RM (Cucu y col., 2011). Tal disminución en la reactividad frente a IgE también ha sido descrita en el alérgeno Pru av 1 de la cereza tras ser glicosilado con glucosa o ribosa, atribuyéndose a cambios irreversibles en la estructura terciaria de la proteína, debidos a modificaciones en los aminoácidos nucleofílicos por interacciones con

productos carbonílicos que causaron la pérdida de epítopos conformacionales (Gruber y col., 2004).

En el caso del OM, la RM aumentó la capacidad de unión a IgE respecto del OM nativo, hecho que se explicaría por la formación de nuevos epítopos o porque se favoreció el reconocimiento de los ya existentes. De forma semejante, en los alérgenos Ara h 1 y Ara h 2 del cacahuete se ha descrito un aumento de la unión a IgE tras RM con diferentes carbohidratos, entre los que estaba la glucosa, explicándose tal aumento por la formación de nuevos puntos de unión a IgE, la exposición de epítopos protegidos en la estructura e, inclusive, por la formación de productos avanzados de la RM capaces de ser reconocidos por IgE (Maleki y col., 2000).

Un aspecto controvertido y común en los estudios revisados, incluido el presente, es el repertorio de IgE específico de cada paciente. Verbigracia, en nuestro estudio, los sueros empleados provienen de pacientes alérgicos a huevo, de los que se conocen las titulaciones frente a clara, yema, OVA y OM, pero no así la especificidad de cada IgE—los epítopos del alérgeno en cuestión que cada paciente reconoce—, es decir, cómo se ha sensibilizado y frente a qué forma de OVA y OM. Los sueros estudiados reconocieron el OM glicado con más facilidad que el nativo, pudiendo hacerse conjeturas dependiendo de si ha habido o no una exposición previa del paciente a OM glicado. Si no ha habido tal exposición, se podría pensar que el OM glicado ha podido desdoblarse parcialmente y exponer epítopos a los que el paciente estaba previamente sensibilizado, o bien que se hayan formado nuevos epítopos que guardan suficiente similitud con los ya existentes. Si ha habido una exposición previa a OM glicosilado, el paciente se ha podido sensibilizar realmente frente a los nuevos epítopos, no existentes en el OM nativo, lo que explica, por ejemplo, que se hayan dado casos de reacciones anafilácticas en pacientes sensibilizados únicamente frente a neoepítopos formados por el procesado y no frente al alérgeno en su forma nativa (Malanin y col., 1995). A tal respecto, en una investigación actual en ratones, se ha descrito que la OVA glicada es más inmunogénica que la nativa ya que la primera se reconoce mejor por células T (Ilchmann y col., 2010).

Nuestros resultados apoyan estudios anteriores sobre la influencia de la RM sobre la capacidad de unión a IgE de algunos alérgenos alimentarios, que han proporcionado resultados diferentes en función del tipo de proteína, del azúcar y de las condiciones de reacción. No obstante son muy escasos los estudios sobre la digestibilidad de alérgenos glicosilados y más aún aquellos que evalúan el reconocimiento

por IgE de los digeridos gastroduodenales, a pesar de la relevancia de los últimos en la patogénesis de la alergia a alimentos.

En nuestro estudio, evaluamos tanto la digestibilidad de la OVA y el OM glicosilados como la capacidad de unión a IgE de sus digeridos duodenales. La OVA glicosilada fue más resistente al proceso digestivo que la nativa, puesto que, tras la digestión gástrica seguida de la fase duodenal, todavía se detectó OVA glicosilada intacta y agregados de elevado peso molecular. Probablemente, la agregación causada por RM dificultó la acción de las enzimas digestivas protegiendo así a la proteína de la hidrólisis. El bloqueo de los residuos de Arg y Lys, sobre los que actúan tripsina y quimotripsina, puede haber contribuido a la menor digestibilidad de la OVA glicosilada. En otros estudios, se ha visto que la RM reduce la digestibilidad de diferentes alérgenos alimentarios y, aunque en muchos de ellos tan solo se evaluó ésta en condiciones gástricas (Maleki y col., 2000; Nakamura y col., 2006), también se ha demostrado tras digestión gastroduodenal *in vitro*, como en el caso de las proteínas de trigo (Simonato y col., 2001) o de la β -lactoglobulina de la leche (Sanz y col., 2007), habiéndose asociado tal resistencia con la polimerización de la proteína. Cuando se evaluó la capacidad de unión de los digeridos duodenales de OVA glicosilada, estos mostraron una reactividad similar a los de la nativa, lo que indica que la reducción inicial de la capacidad de unir IgE que se dio en la OVA glicosilada respecto de la nativa se vio contrarrestada al dificultarse la digestión, resultando en una menor pérdida de epítomos. En algunos casos, como es el de la tropomiosina de calamar, aunque haya habido una reducción inicial de la capacidad de unión a IgE de la proteína glicosilada, la disminución de la digestibilidad, tras ser glicosilado con ribosa, fue tan acentuada que los digeridos resultantes de la proteína glicosilada fueron más reactivos que los de la nativa (Nakamura y col., 2006), mas no se llegó a evaluar la reactividad de los digeridos duodenales, lo que hubiera hecho el estudio más interesante. Al OM no lo afectó la RM en términos de digestibilidad siguiendo un patrón de digestión similar al del OM nativo. En comparación con la OVA glicosilada, la polimerización en el OM glicosilado fue menor, pudiendo no ser suficiente como para ejercer un efecto protector, de hecho, los agregados formados por RM se digirieron rápidamente durante la digestión gástrica. Por otra parte, aunque la RM pudo haber creado neoepítomos en el OM, estos sufrieron un grado de digestión similar al de la nativa, dando digeridos duodenales con similar capacidad de unión a IgE.

3.2 Interacciones no covalentes con polisacáridos

Los alimentos contienen proteínas y polisacáridos, que podrían interactuar formando biopolímeros mixtos, tanto en el propio alimento, como durante la digestión fisiológica. La investigación del comportamiento durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de mezclas de OVA u OM con diferentes polisacáridos de uso común en la industria alimentaria (P, G y X), y de su unión a IgE, puso de manifiesto una reducción de la digestibilidad de la OVA y OM en presencia de los polisacáridos. El hecho de que la OVA nativa se digiriese menos en presencia de P, G y X sugiere que ésta pudo interactuar débilmente con los polisacáridos, especialmente en las condiciones ácidas de la digestión gástrica, y que tales interacciones dificultaron la hidrólisis de la proteína. En el caso del OM, que se hidroliza rápidamente con pepsina, tal efecto protector se vio reflejado en la digestión duodenal. A pH ácido, tanto en los propios alimentos como en el estómago, las proteínas, por debajo de su pI, pueden establecer asociaciones electrostáticas con polisacáridos aniónicos, como G y P, así como atracciones no iónicas –hidrofóbicas o mediante puentes de hidrógeno- que refuerzan las anteriores o son responsables de las uniones con polisacáridos no aniónicos, como X (Mackie y Macierzanka, 2010). A pH neutro, típico del duodeno, todavía pueden darse interacciones electrostáticas entre los polisacáridos aniónicos y las regiones cargadas positivamente de las proteínas, que también se intensifican mediante atracciones no iónicas (Dickinson 1998). Tales asociaciones podrían ejercer un efecto protector sobre la digestión de las proteínas, como se ha encontrado en estudios en los que se ha investigado el efecto de la presencia de P, G y X en la digestión *in vitro* de proteínas de cacahuete (Mouecoucou y col., 2004) y β -lactoglobulina (Mouecoucou y col., 2003).

En nuestro caso, la mayor protección se dio en presencia de P, cuya capacidad de formar geles, especialmente en condiciones ácidas, podría haber ralentizado el avance de la digestión como se ha visto, tanto *in vivo* como *in vitro*, en el alérgeno Act c 2 del kiwi (Polovic y col., 2007). Aunque tal capacidad se ve perjudicada por las condiciones intestinales, se ha descrito que los geles de P, formados en condiciones gástricas, podrían resistir lo suficiente en el duodeno como para ejercer un efecto protector sobre la proteína en términos de digestibilidad (Polovic y col., 2009).

Las pruebas de ELISA de inhibición, una vez descartada la unión a IgE de G, P y X, mostraron que los digeridos duodenales de OVA y OM obtenidos en presencia de

polisacáridos tuvieron mayor capacidad de unir IgE que los controles de OVA y OM digeridos en ausencia de polisacáridos. Por una parte, ésta mayor alergenicidad *in vitro* podría atribuirse al menor grado de digestión que se dio en tales muestras, sin embargo, las diferencias observadas en cuanto a digestibilidad parecían demasiado pequeñas para justificar que la reactividad frente a IgE fuese significativamente mayor. Por otra parte, se ha sugerido que durante la digestión de las proteínas en presencia de polisacáridos, estos interaccionan con los productos de digestión en mayor medida que con la proteína intacta (Mouecoucou y col., 2003, 2004) y, de hecho, los análisis mediante SEC pusieron de manifiesto la posible interacción de los productos de digestión gástricos y duodenales de la OVA y el OM con los distintos polisacáridos.

Basándonos en estos resultados, se podría pensar que los fragmentos peptídicos producidos por la pepsina durante la digestión gástrica simulada podrían haber interaccionado electrostáticamente con P y G, resistiendo parcialmente, al menos, la hidrólisis duodenal posterior. Asimismo, los péptidos conteniendo aminoácidos básicos como Arg o Lys, liberados por la acción de la tripsina, también podrían interaccionar electrostáticamente con los polisacáridos aniónicos como P o G, mientras que con X se darían interacciones no iónicas. Si bien se ha indicado que la interacción de polisacáridos con digeridos gástricos o duodenales reduce la unión a IgE, lo que se ha atribuido a un enmascaramiento de los epítomos por parte del polisacárido (Mouecoucou y col., 2003, 2004), también es razonable suponer que los complejos formados entre polisacáridos y fragmentos peptídicos hayan contribuido a conservar los epítomos.

A tal respecto, las fracciones de elevado peso molecular presentes en los digeridos duodenales de OVA y OM fueron recolectadas tras el análisis mediante SEC y su capacidad de unir IgE fue evaluada cualitativamente, mostrando que todas las fracciones, aunque con diferente intensidad, poseían reactividad frente a IgE. Debe destacarse que se han encontrado, entre los diferentes carbohidratos unidos a proteínas, algunos que pueden dar reacciones cruzadas con determinados anticuerpos IgE y que se denominan determinantes antigénicos de carbohidratos (CCD, Commins y Platts-Mills, 2010). En particular, se ha visto que los residuos de β 1,2-xilosa reaccionan *in vitro* con IgE específicas de alergia al polen y a alimentos (Kaulfust-Soboll y col., 2011), lo que podría explicar la elevada reactividad frente a IgE encontrada en nuestro estudio.

Estos resultados destacan la importancia de la matriz del alimento en la digestibilidad de los alérgenos y en su capacidad potencial para desencadenar una respuesta inmune. Además, el hecho de que los polisacáridos puedan proteger a las

proteínas o a sus productos de degradación de la acción de las enzimas digestivas, manteniendo su potencial alergénico, podría ser de especial importancia teniendo en cuenta que la absorción de proteínas en presencia de polisacáridos aniónicos puede estar modulada (Schmidgall y Hensel, 2002), como sucede con la P, que es capaz de adherirse al mucus de la mucosa intestinal permitiendo mayor contacto de las moléculas unidas a P y el epitelio intestinal (Liu y col., 2005) con el subsiguiente efecto en la capacidad de desencadenar una respuesta alérgica.

3.3 Interacción con lípidos

La escasa bibliografía existente sobre el comportamiento de alérgenos de huevo en emulsiones alimentarias, referido a digestibilidad y alergenicidad, motivó su estudio. Para tal menester se preparó una emulsión O/W, a base de huevo liofilizado y aceite de oliva purificado, cuya estabilidad y características fueron evaluadas. La monitorización de la conductividad, sin apenas variación durante las primeras 48 horas, permitió definir el periodo en el que la emulsión elaborada conservaba las características iniciales. El estudio de la microestructura de la emulsión recién formada reveló la presencia de pequeñas gotas de aceite, con una capa interfacial alrededor, homogéneamente dispersas en la disolución proteica. Después de 4 horas no se observaron cambios en la microestructura, especialmente aquellos que son indicadores de desestabilización, como la floculación o coalescencia (McClements, 1999), procediéndose a estudiar en ese intervalo de tiempo la digestibilidad *in vitro* de la emulsión.

La digestión gastroduodenal *in vitro* de la emulsión no mostró diferencias respecto del control de huevo en cuanto al patrón de digestión, mas sí se vio ligeramente favorecida la hidrólisis en la emulsión. Otras proteínas alimentarias han mostrado mucha mayor susceptibilidad a la hidrólisis al estar emulsionadas, tal es el caso de la β -caseína y la β -lactoglobulina de la leche, cuya digestión gástrica es 2 y 10 veces más rápida, respectivamente, al formar parte de una emulsión O/W con aceite de oliva, siendo relacionados tales cambios con el desdoblamiento de las proteínas en su interacción con la interfase (Macierzanka y col., 2009). De hecho, es sabido que la β -lactoglobulina se desdobra con facilidad en su adsorción a la interfase durante la emulsificación (Husband y col., 2001), lo que puede ser responsable del aumento en su digestibilidad, ya que tales estados de desdoblamiento favorecen el acoplamiento de la pepsina a la cadena polipeptídica que va a hidrolizar (Kageyama, 2002). En la emulsión de huevo sólo se favoreció ligeramente la digestión de algunas proteínas

entre las que destacó la OVA, por ser la mayoritaria en la clara. Esto indica que, en el caso de las proteínas de clara de huevo no tienen lugar cambios inducidos por la adsorción que aumenten de modo importante su flexibilidad o susceptibilidad a la pepsina, probablemente porque las proteínas más resistentes a la acción de la pepsina, OVA y LYS, poseen una gran estabilidad conformacional a pH 2.0 (de Laureto y col., 2002; Tatsumi y col., 1999). De hecho, ni OVA ni LYS son buenas emulsionantes, y son los fosfolípidos de la yema los componentes que más contribuyen a esta propiedad en el huevo (Mine y col., 1992). Posteriormente, en el medio duodenal, los ácidos biliares, desplazarían a las proteínas que se hubieran adsorbido, por lo que la hidrólisis por enzimas pancreáticas tendría lugar sobre todo en disolución (Macierzanka y col., 2009).

La capacidad de unión a IgE del huevo emulsionado no fue significativamente distinta a la del huevo control. En cambio, sí se vieron diferencias en la reactividad frente a IgE entre los digeridos gástricos y duodenales de huevo y huevo emulsionado. Estos últimos presentaron menor capacidad de unir IgE que los digeridos de huevo, hecho que se atribuyó al mayor grado de hidrólisis que se vio en la emulsión, gracias al cual se pudo dar mayor pérdida de epítomos durante la digestión, con la subsiguiente reducción del potencial alergénico. Esta observación pone de nuevo de manifiesto la importancia de la resistencia a la digestión en los alérgenos alimentarios (Astwood y col., 1996), aunque tampoco podría descartarse cierto enmascaramiento de epítomos en su adsorción a la interfase.

4. Efecto inmunomodulador de fórmulas de huevo procesado

En un intento de esclarecer los mecanismos subyacentes de la OIT se estudió el efecto inmunomodulador de clara de huevo calentada con bajo contenido de OM en ratones Balb/c alérgicos a huevo. En primer lugar, se evaluó la digestibilidad *in vitro* de la fórmula de clara de huevo calentada con bajo contenido en OM, encontrándose una elevada susceptibilidad a la hidrólisis comparada con clara de huevo, que es probablemente responsable del carácter hipoalergénico de la fórmula. Inicialmente, el tratamiento térmico afectaría a la capacidad de unión a IgE de la OVA, como vimos anteriormente y, presumiblemente a la de otros alérgenos mayoritarios de la clara que son termolábiles, como LYS y OT, con la subsiguiente reducción del potencial alergénico. Además, el tratamiento térmico favorece claramente la digestión de tales

alérgenos, lo que contribuye a acelerar la destrucción de epítomos durante el proceso digestivo. Dado que el OM es termoestable, y genera durante la digestión gástrica fragmentos resistentes a la digestión duodenal con actividad inhibidora de tripsina y que contienen epítomos de unión a IgE, al reducir su contenido en la fórmula de inmunoterapia se mejora la digestibilidad y se contribuye a que esta sea hipoalérgica. La seguridad de la fórmula de OIT es requisito deseable mas no imprescindible, de hecho en muchos protocolos de OIT se usa el alimento ofensivo tal cual, si bien en cantidades que no producen sintomatología clínica (Buchanan y col., 2007; Vickery y col., 2010). No obstante, la capacidad terapéutica es un requisito imprescindible en los preparados de OIT y ésta podría estar relacionada con una elevada digestibilidad, puesto que durante la digestión gastrointestinal se liberan péptidos con capacidad inmunomoduladora que son reconocidos por células T. En esta misma línea, se ha visto como un hidrolizado de trigo que fue administrado a pacientes alérgicos tuvo capacidad de desensibilizar sin que hubiera peligro durante el tratamiento por ser hipoalérgico (Tanabe, 2007). También se ha descrito el poder terapéutico en ratones de una mezcla de péptidos del alérgeno del cacahuete Ara h 2 (Li y col., 2001) y, recientemente, se ha comprobado la capacidad de desensibilizar ratones alérgicos a huevo con fragmentos peptídicos menores de 1.4 kDa procedentes de un hidrolizado de clara de huevo (Yang y col., 2009).

La OIT resultó provechosa, a la vista de la concentración de histamina en sangre tras la provocación, significativamente menor en los grupos tratados. Los niveles de IgE también fueron significativamente inferiores en los ratones tratados que en los alérgicos, aunque, en los primeros, la IgE específica frente a clara fue mayor que en el control negativo, lo cual avala que no siempre niveles relativamente elevados de IgE específica van a desembocar en una respuesta alérgica (Urisu y col., 1999), pues probablemente haya mecanismos que atenúen la misma.. A tales mecanismos podrían contribuir las distintas subclases de IgG. Así, el claro aumento de IgG e IgG2a específicas tras la OIT podría aminorar la respuesta alérgica, ya sea por una competición directa frente a IgE, por unirse a los epítomos, o de manera independiente, enviando señales de inactivación a los mastocitos a través de los receptores FcγRIIB (Uermosi y col., 2010). Además, también se ha encontrado en estudios clínicos de OIT un incremento de la IgG2a, equivalente a la IgG4 en humanos (Mousallem y Burks, 2012), lo que refuerza su utilizad como biomarcador para monitorizar la progresión del tratamiento.

La estimulación de esplenocitos con clara de huevo y el posterior análisis de la producción de citoquinas mostró un claro aumento de la respuesta Th1 sobre la Th2, que podría atribuirse a una elevada producción de IL-10. En otras investigaciones sobre la OIT se han descrito niveles altos de IL-10 de forma pasajera durante la inmunoterapia, coincidiendo con el cambio a una respuesta predominantemente Th1 (Vickery y col., 2010). La diferencia en los niveles de IL-10 determinados en los grupos de ratones tratados puso de manifiesto la importancia de la dosis en los efectos de la OIT. Tanto la dosis alta como baja de consiguieron reducir la respuesta alérgica, sin embargo, los cambios inmunológicos se vieron afectados por la dosis empleada, siendo más pronunciados en los ratones tratados con mayor cantidad.

La monitorización semanal de los niveles de IgA específicos en heces a lo largo del estudio, plantea cuestiones de interés. Los niveles bajos de IgA específica en el intestino pueden ser indicadores de un estado susceptible de desarrollar alergia (Frossard y col., 2004), pero no siempre los niveles altos van a ser un marcador fiable de tolerancia. De hecho, se han descrito casos de ratones sensibilizados que presentaban niveles altos de IgA específica en heces (Lee y col., 2001). Se piensa que tanto los ratones alérgicos como los tolerantes tienen capacidad de producir IgA mediante las poblaciones celulares presentes en las placas de Peyer, aunque tal producción va a ser mayor en ratones tolerantes (Frossard y col., 2004). De acuerdo con tales resultados, al final de la OIT se comprobó que los grupos de OIT presentaron mayores concentraciones de IgA específica en heces que el positivo o negativo, pudiendo ser un indicador favorable. No obstante, conviene una interpretación cuidadosa de los niveles de IgA específicos. Los niveles elevados de IgA específica en suero se relacionan con sensibilización a alimentos, aunque se ha especulado que tal incremento es debido a que, en individuos tolerantes, la producción de IgA se da mayoritariamente en las placas de Peyer, permitiendo liberar elevadas cantidades de la misma en el intestino, mientras que en alérgicos se genera fundamentalmente en nódulos linfáticos mesentéricos con el subsiguiente aumento de IgA a nivel sérico (Frossard y col., 2004). Por tanto, la inclusión del ratio de niveles específicos de IgA intestinal / IgA sérica como marcador del estado del individuo alérgico podría ser útil, valorado junto con el resto de marcadores habituales.

Por último, un aspecto de gran importancia es establecer el grado de protección proporcionado por la OIT y determinar si se ha conseguido alcanzar la tolerancia o tan solo desensibilización. Ello requeriría llevar a cabo estudios en los que se incluyan

grupos adicionales de ratones a los que, una vez terminada la OIT, se administrarían distintas dosis de mantenimiento para ver la posibilidad de recaer o no a largo plazo, e identificar biomarcadores que sirvan como indicadores de un estatus seguro o de riesgo. No obstante, aun en aquellos casos en los que no sea posible inducir tolerancia oral, las mejoras alcanzadas por la OIT relatadas en el presente estudio y en la bibliografía (Mousallem y Burks, 2012) la hacen más adecuada que la evitación total del huevo, como forma de encarar la alergia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Distintas condiciones de hidrólisis que imitan estados de saciedad y ayuno afectan a la digestión gástrica de la LYS, fundamentalmente por la influencia del pH y por la presencia de fosfatidilcolina, que la protege ligeramente de la hidrólisis. Los fragmentos proteicos liberados durante la digestión gástrica *in vitro* de la LYS muestran una notable capacidad de unión a IgG e IgE.
2. La LYS precipita en condiciones intestinales que simulan estados prandiales y posprandiales. La fosfatidilcolina evita parcialmente la precipitación de la LYS por acción de las sales biliares. Este comportamiento puede afectar al papel defensivo y a la alergenicidad de la proteína.
3. La S-OVA posee menor reactividad frente a IgE que la OVA, probablemente por la modificación que sufren algunos aminoácidos contenidos en regiones de la proteína nativa identificadas como epítomos. La S-OVA es más resistente a la digestión gástrica *in vitro* que la forma nativa, pero esta diferencia se atenúa durante la digestión duodenal, por lo que los hidrolizados de ambas presentan similar reactividad frente a IgE.
4. El tratamiento térmico reduce la capacidad de unión a IgE de la OVA, lo que, junto con el aumento de la digestibilidad que produce, anula prácticamente la capacidad de unión a IgE de sus digeridos duodenales. El tratamiento térmico también disminuye la unión a IgE del OM, pero no afecta a su digestibilidad, ni a la reactividad frente a IgE de sus digeridos duodenales.
5. La reacción de Maillard con glucosa disminuye la capacidad de unión a IgE de la OVA, aunque también reduce su digestibilidad, por lo que los digeridos duodenales de la OVA glicada muestran una unión a IgE similar a los de la nativa.

6. La reacción de Maillard con glucosa aumenta la capacidad de unión a IgE del OM, pero no afecta a su digestibilidad, ni a la unión a IgE de sus digeridos duodenales.
7. La presencia de pectina, goma arábiga y xilano dificultan en distinta medida la digestión de OVA y OM, ya sea al interaccionar con la proteína nativa o con fragmentos peptídicos resultantes de su hidrólisis. La mezcla con polisacáridos aumenta la reactividad frente a IgE de las proteínas y de sus digeridos gastroduodenales, siendo el efecto dependiente del tipo de proteína y polisacárido.
8. La digestibilidad *in vitro* de proteínas de huevo formando parte de una emulsión estable de aceite en agua es ligeramente mayor que la de las proteínas de huevo no emulsionadas. Tal variación en la digestibilidad afecta a la unión a IgE de los digeridos duodenales de la emulsión, que es menor que la de los digeridos de huevo en solución.
9. La hipoalergenicidad y las propiedades terapéuticas de la clara de huevo calentada con bajo contenido en OM probablemente residan en su elevada digestibilidad, inducida por el procesado. La inmunoterapia oral con dicha fórmula en ratones impide reacciones alérgicas manifiestas tras una prueba de provocación oral, disminuyendo la liberación de histamina y la concentración sérica de IgE específica.
10. La inmunoterapia oral produce un incremento del balance Th1/Th2, al reducir el nivel de IL-4 y aumentar el de IFN- γ , en parte regulado por la IL-10, y causa un aumento de los niveles de IgG e Ig2a específicas que podrían atenuar la respuesta alérgica. Además, induce mayores niveles de IgA específica en el intestino que podrían ejercer una función beneficiosa a nivel de la mucosa intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

En este apartado se incluyen las referencias citadas en la Introducción y en la Discusión General.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2009) *Cellular and Molecular Immunology* 6th edn.: WB Saunders Company, Philadelphia (USA).

Ajandouz EH, Puigserver A (1999). Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: Effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1786-1793.

Akdis CA, Akdis M (2011). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 18-27.

Akdis M, Blaser K, Akdis CA (2005). T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116: 961-968.

Ali BH, Ziada A, Blunden G (2009). Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1-8.

Allen CW, Campbell DE, Kemp AS (2007). Egg allergy: Are all childhood food allergies the same? *Journal of Pediatrics and Child Health* 43: 214-218.

Anet J (1985). Allergens in the white and yolk of hens egg - a study of IgE binding by egg proteins. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 77: 364-371.

Astwood J, Leach JN, Fuchs RL (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273.

Benech A (2008). Gum Arabic - A functional hydrocolloid for beverages. *Agro Food Industry Hi-Tech* 19: 58-59.

Besler M, Steinhut H, Paschke A (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B* 756: 207-228.

Bischoff S, Crowe SE (2005). Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology* 128: 1089-1113.

Bohle B, Zwoelfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, Keller W, Zuidmeer L, van Ree R, Wefel T, Ebner C (2006). Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell- mediated reactivity in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118: 242-249.

Boyano Martínez T, García-Ara C, Díaz-Pena JM, Muñoz FM, García Sánchez G, Esteban MM (2001). Validity of specific IgE antibodies in children with egg allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 31: 1464-1469.

Braginsky L, Belevitskaya M (1996) Liquid-Liquid Systems. En *Kinetics of droplets breakup in agitated vessels.*, Kulov N (ed). New York: Nova Science.

Bredehorst R (2001). What establishes a protein as an allergen? *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications* 756: 33-40.

Buchanan AD, Green TD, Jones SM, Scurlock AM, Christie L, Althage KA, Steele PH, Pons L, Heim RM, Lee LA, Burks AW (2007). Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119: 199-205.

Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, Kapiotis S, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S (1998). Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101: 67-74.

Burks AW, Laubach S, Jones SM (2008). Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121: 1344-1350.

Burks AW, Sampson HA (1993). Food allergies in children. *Current Problems in Pediatrics* 23: 230-252.

Bush RK, Hefle SL (1996). Food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36: S119-S163.

Campbell L, Raikos V, Euston SR (2003). Modification of functional properties of egg-white proteins. *Nahrung-Food* 47: 369-376.

Caubet JC, Wang J (2011). Current understanding of egg allergy. *Pediatric Clinics of North America* 58: 427-443.

Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A, Staden U, Nocon M, Beyer K, Niggemann B (2005). The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. *Clinical and Experimental Allergy* 35: 268-273.

Chapman JA, Bernstein IL, Lee RE, Oppenheimer J, Nicklas RA, Portnoy JM, Sicherer SH, Schuller DE, Spector SL, Khan D, Lang D, Simon RA, Tilles SA, Blessing-Moore J, Wallace D, Teuber SS (2006). Food allergy: a practice parameter. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 96: S1-S68.

Chehade M, Mayer L (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 3-12.

Chen J, Hu Y, Allen KJ, Ho MHK, Li HQ (2011). The prevalence of food allergy in infants in Chongqing, China. *Pediatric Allergy and Immunology* 22: 356-360.

Chiang WC, Kidon MI, Liew WK, Goh A, Tang JP, Chay OM (2007). The changing face of food hypersensitivity in an Asian community. *Clinical and Experimental Allergy* 37: 1055-1061.

Colver AF, Nevantaus H, Macdougall CF, Cant AJ (2005). Severe food-allergic reactions in children across the UK and Ireland, 1998-2000. *Acta Paediatrica* 94: 689-695.

Commins SP, Platts-Mills TAE (2010). Allergenicity of carbohydrates and their role in anaphylactic events. *Current Allergy and Asthma Reports* 10: 29-33.

Corzo-Martinez M, Soria AC, Belloque J, Villamiel M, Moreno FJ (2010). Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal* 20: 742-752.

Cucu T, Platteau C, Taverniers I, Devreese B, de Loose M, de Meulenaer B (2011). ELISA detection of hazelnut proteins: effect of protein glycation in the presence or absence of wheat proteins. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 28: 1-10.

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3(+) T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9(+) IL-10(+) Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology* 9: 1347-1355.

De Groot J, de Jongh HHJ (2003). The presence of heat-stable conformers of ovalbumin affects properties of thermally formed aggregates. *Protein Engineering* 16: 1035-1040.

De Laureto PP, Frare E, Gottardo R, van Dael H, Fontana A (2002). Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Protein Science* 11: 2932-2946.

Dickinson E (1992). Emulsifying and foaming properties of proteins. *Food Science & Technology Today* 6: 152-155.

Dickinson E, Stainsby G (1982). Colloids in food. Applied Science Publishers, Essex (UK).

Donovan JW, Mapes CJ, Davis JG, Garibaldi JA (1975). Differential scanning calorimetric study of stability of egg-white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26: 73-83.

Drakos A, Kiosseoglou V (2008). Depletion flocculation effects in egg-based model salad dressing emulsions. *Food Hydrocolloids* 22: 218-224.

Ebo D, Stevens, WJ. (2001). IgE-mediated food allergy--extensive review of the literature. *Acta Clinica Belgica* 56: 234-247.

Ebringerova A, Heinze T (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21: 542-556.

Ebringerova A, Hromadkova Z (1999) Xylans of industrial and biomedical importance. En *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol 16*, Harding SE (ed), Vol. 16, pp 325-346. Andover: Intercept Ltd Scientific, Technical & Medical Publishers.

Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S (2004). Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 1398-1403.

Eigenmann P (2000). Anaphylactic reactions to raw eggs after negative challenges with cooked eggs. *The journal of allergy and clinical immunology* 105: 587-588.

Elsayed S, Hammer ASE, Kalvenes MB, Florvaag E, Apold J, Vik H (1986). Antigenic and allergenic determinants of ovalbumin. 1. Peptide-mapping, cleavage at the methionyl peptide-bonds and enzymatic-hydrolysis of native and carboxymethyl OA. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 79: 101-107.

Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K (2010). Adaptive Immune Regulation in the Gut: T Cell-Dependent and T Cell-Independent IgA Synthesis. *Annual Reviews of Immunology*: 243-273.

Foetisch K, Faeh J, Wuethrich B, Altmann F, Haustein D, Vieths S (1998). IgE antibodies specific for carbohydrates in a patient allergic to gum arabic (Acaciasenegal). *Allergy* 53: 1043-1051.

Fontana A, Fassina G, Vita C, Dalzoppo D, Zamai M, Zambonin M (1986). Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* 25: 1847-1851.

Friedman M (1996). Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 631-653.

Frossard CP, Hauser C, Eigenmann PA (2004). Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114: 377-382.

Gammon G, Geysen HM, Apple RJ, Pickett E, Palmer M, Ametani A, Sercarz EE (1991). T-cell determinant structure - cores and determinant envelopes in 3 mouse major histocompatibility complex haplotypes. *Journal of Experimental Medicine* 173: 609-617.

Gass J, Vora H, Hofmann AF, Gray GM, Khosla C (2007). Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. *Gastroenterology*, 133: 16-23.

Girard M, Turgeon SL, Paquin P (2002). Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science* 67: 113-120.

Gorbenko GP, Ioffe VM, Kinnunen PKJ (2007). Binding of lysozyme to phospholipid bilayers: Evidence for protein aggregation upon membrane association. *Biophysical Journal* 93: 140-153.

Gruber P, Becker WM, Hofmann T (2005). Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2289-2296.

Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hofmann T (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4002-4007.

Gu J, Matsuda T, Nakamura R (1986). Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shelled eggs. *J. Food Science* 51: 1448-1450.

Gustafsson D, Sjoberg O, Foucard T (2003). Sensitization to food and airborne allergens in children with atopic dermatitis followed up to 7 years of age. *Pediatric Allergy and Immunology* 14: 448-452.

Halling PJ (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15: 155-203.

Hammershoj M, Larsen LB, Andersen AB, Qvist KB (2002). Storage of shell eggs influences the albumen gelling properties. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 35: 62-69.

Handa A, Kuroda N (1999). Functional improvements in dried egg white through the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1845-1850.

Hashida S, Ishikawa E, Nakamichi N, Sekino H (2002). Concentration of egg white lysozyme in the serum of healthy subjects after oral administration. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29: 79-83.

Hegg PO, Martens H, Lofqvist B (1979). Effects of Ph and Neutral Salts on the Formation and Quality of Thermal Aggregates of Ovalbumin - Study on Thermal Aggregation and Denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30: 981-993.

Heine RG, Laske N, Hill DJ (2006). The diagnosis and management of egg allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* 6: 145-152.

Hirose J, Kitabatake N, Kimur A, Narita H (2004). Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68: 2490-2497.

Hodge J (1953). Dehydrated foods - chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1: 928-943.

Hoffman D (1983). Immunochemical identification of the allergens in egg-white. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 71: 481-486.

Holen E, Bolann B, Elsayed S (2001). Novel B and T cell epitopes of chicken ovomucoid (Gal d 1) induce T cell secretion of IL-6, IL-13, and IFN-gamma. *Clinical and Experimental Allergy* 31: 952-964.

Holen E, Elsayed S (1990). Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 91: 136-141.

Holgate ST, Polosa R (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews. Immunology* 8: 218-230.

Honma K, Kohno Y, Saito K, Shimojo N, Horiuchi T, Hayashi H, Suzuki N, Hosoya T, Tsunoo H, Niimi H. (1996) Allergenic epitopes of ovalbumin (OVA) in patients with hen's egg allergy: inhibition of basophil histamine release by haptenic ovalbumin peptide. *Clinical and Experimental Immunology* 103: 446-453.

Honma K, Kohno Y, Saito K, Shimojo N, Tsunoo H, Niimi H (1994). Specificities of IgE, IgG and IgA Antibodies to Ovalbumin - Comparison of Binding Activities to Denatured Ovalbumin Or Ovalbumin Fragments of IgE Antibodies with Those of IgG Or IgA Antibodies. *International Archives of Allergy and Immunology* 103: 28-35.

Huntington JA, Stein PE (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B* 756: 189-198.

Husband FA, Garrood MJ, Mackie AR, Burnett GR, Wilde PJ (2001). Adsorbed protein secondary and tertiary structures by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive index matched emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 859-866.

Ibrahim HR, Inazaki D, Abdou A, Aoki T, Kim M (2005). Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: a novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1726: 102-114.

Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, Yamamoto Y, Yamamoto H, Henle T, Kurts C, Kalinke U, Vieths S, Toda M (2010). Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: Role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125: 175-183.

Ishimaru T, Ito K, Tanaka M, Matsudomi N (2010). Thermostabilization of ovalbumin by alkaline treatment: examination of the possible roles of D-serine residues. *Protein Science* 19: 1205-1212.

Jankiewicz A, Baltes W, Bogl KW, Dehne LI, Jamin A, Hoffmann A, Hausteiner D, Vieths S (1997). The influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75: 359-370.

Jiménez-Castaño L, Villamiel M, López-Fandiño R (2007). Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids* 21: 433-443.

Jiménez-Castaño L, Villamiel M, Martín-Alvarez PJ, Olano A, López-Fandiño R (2005). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of beta-lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids* 19: 831-837.

Jurado-Palomo J, Fiandor-Roman AM, Bobolea ID, Sanchez-Pastor S, Pascual CY, Quirce S (2010). Oral Challenge with Pasteurized Egg White from *Gallus domesticus*. *International Archives of Allergy and Immunology* 151: 331-335.

Kacurakova M, Wellner N, Ebringerova A, Hromadkova Z, Wilson RH, Belton PS (1999). Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocolloids* 13: 35-41.

Kageyama T (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 288-306.

Kahlert H, Petersen A, Becker WM, Schlaak M (1992). Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal-D-II) with monoclonal-antibodies and patients IgE. *Molecular Immunology* 29: 1191-1201.

Kaulfust-Soboll H, Mertens M, Brehler R, von Schaewen A (2011). Reduction of cross-reactive carbohydrate determinants in plant foodstuff: elucidation of clinical relevance and implications for allergy diagnosis. *Plos One* 6: e17800.

Kato Y, Watanabe K, Sato Y (1978). Effect of Maillard reaction on attributes of egg-white proteins. *Agricultural and Biological Chemistry* 42: 2233-2237.

Kato Y, Matsuda T, Kato N, Nakamura R (1988). Browning and Protein Polymerization Induced by Amino Carbonyl Reaction of Ovalbumin with Glucose and Lactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 806-809.

Kim MJ, Lee JW, Yook HS, Lee SY, Kim MC, Byun MW (2002). Changes in the antigenic and immunoglobulin E-binding properties of hen's egg albumin with the combination of heat and gamma irradiation treatment. *Journal of Food Protection* 65: 1192-1195.

Kint S, Tomimatsu Y (1979). Raman Difference Spectroscopic Investigation of Ovalbumin and S-Ovalbumin. *Biopolymers* 18: 1073-1079.

Komata T, Soderstrom L, Borres MP, Tachimoto H, Ebisawa M (2007). The predictive relationship of food-specific serum IgE concentrations to challenge outcomes for egg and milk varies by patient age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119: 1272-1274.

Konishi Y, Kurisaki JI, Kaminogawa S, Yamauchi K (1985). Determination of Antigenicity by Radioimmunoassay and of Trypsin Inhibitory Activities in Heat Or Enzyme Denatured Ovomucoid. *Journal of Food Science* 50: 1422-1426.

Konstantinou GN, Kim JS (2012). Paradigm shift in the management of milk and egg allergy: baked milk and egg diet. *Immunology and Allergy Clinics in North America* 32: 151-164.

Kostewicz ES, Brauns U, Becker R, Dressman JB (2002). Forecasting the oral absorption behavior of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media. *Pharmaceutical Research* 19: 345-349.

Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y (2000). Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6261-6266.

Kraut A, Peng ZK, Becker AB, Warren CPW (1992). Christmas candy makers asthma - IgG4-mediated pectin allergy. *Chest* 102: 1605-1607.

Kristinsdottir H, Clausen M, Ragnarsdottir HS, Halldorsdottir IH, McBride D, Beyer K, Sigurdardottir SP (2011). Prevalence of food allergy in Icelandic infants during first year of life. *Laeknabladid* 97: 11-18.

Labuza TP (1977). The properties of water in relationship to water binding in foods: a review. *Journal of Food Processing and Preservation* 1: 167-190.

Lea CH, Hannan RS (1949). Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. 1. The effect of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochimica Et Biophysica Acta* 3: 313-325.

Lechevalier V, Croguennec T, Nau F, Guerin-Dubiard C (2007). Ovalbumin and gene related proteins *en Bioactive egg compounds*. Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (Eds). Springer-Berlak.

Ledl F (1990). Chemical pathways of the Maillard in *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R (Eds). Birkhauser Verlag.

Lee SY, Huang CK, Zhang TF, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA, Li XM (2001). Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. *Clinical Immunology* 101: 220-228.

Lemon-Mule H, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Wegrzyn A (2008). Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122: 977-983.

Letterio JJ, Roberts AB (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 16: 137-161.

Li-Chan E, Nakai S (1989). Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Reviews in Poultry Biology* 2: 21-58.

Li SD, Li XM, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA (2001). Modulation of peanut allergy by peptide-based immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: S233-S233.

Liu LS, Fishman ML, Hicks KB, Kende M (2005). Interaction of various pectin formulations with porcine colonic tissues. *Biomaterials* 26: 5907-5916.

Macierzanka A, Sancho AI, Mills ENC, Rigby NM, Mackie AR (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of beta-casein and beta-lactoglobulin. *Soft Matter* 5: 538-550.

Mackie A, Macierzanka A (2010). Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15: 102-108.

Maillard LC (1912). The action of amino acids on sugar; The formation of melanoidin by a methodic route. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L'Academie Des Sciences* 154: 66-68.

Malaki-Nik A, Wright AJ, Corredig M (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83: 321-330.

Malanin K, Lundberg M, Johansson SGO (1995). Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy* 50: 988-991.

Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, Burks AW, Bannon GA (2000). Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *The Journal of Immunology* 164: 5844-5849.

Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106: 763-768.

MARM (2009). Estudio de la cadena de valor y formación de precios del sector del huevo.

Martins S (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* 11: 364-373.

Martos G, Contreras P, Molina E, López-Fandiño R (2010). Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5640-5648.

Matsuda T, Kato Y, Nakamura R (1991). Lysine loss and polymerization of bovine beta-lactoglobulin by amino carbonyl reaction with lactulose (4-O-beta-D-galactopyranosyl-D-fructose). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1201-1204.

Matsuda T, Watanabe K, Sato Y (1981). Independent thermal unfolding of ovomucoid domains. *Biochimica Et Biophysica Acta* 669: 109-112.

McClements DJ (1999) *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, Boca Raton, Florida: CRC Press.

McClements DJ (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9: 305-313.

McReynolds L, Omalley BW, Nisbet AD, Fothergill JE, Givol D, Fields S, Robertson M, Brownlee GG (1978). Sequence of Chicken Ovalbumin Messenger-Rna. *Nature* 273: 723-728.

Mehl A, Wahn U, Niggemann B (2005). Anaphylactic reactions in children - a questionnaire-based survey in Germany. *Allergy* 60: 1440-1445.

Miller H, Campbell DH (1950). Skin test reactions to various chemical fractions of egg white and their possible clinical significance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 21: 522-524.

Mills E, Moreno F, Sancho A, Jenkins J, Wichers H, Wageningen U (2004) Processing approaches to reducing allergenicity in proteins. En *Proteins in Food Processing*, Yada R (ed), pp 396-421. CRC Press

Mine Y (1995). Recent advances in the understanding of egg-white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology* 6: 225-232.

Mine Y (2002). Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World's Poultry Science Journal* 58: 31-39.

Mine Y, Kobayashi H, Chiba K, Tada M (1992). P-31 NMR-study on the interfacial adsorptivity of ovalbumin promoted by lysophosphatidylcholine and free fatty-acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1111-1115.

Mine Y, Rupa P (2003). Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein Engineering*. 16: 747-752.

Mine Y, Zhang J (2002). Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 1070-1074.

Mine Y, Yang M (2007). Epitope characterization of ovalbumin in BALB/c mice using different entry routes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1774: 200-211.

Mine Y, Yang M (2008). Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4874-4900.

Mine Y, Zhang JW (2002). Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2679-2683.

Mine Y, Zhang JW (2003). Surfactants enhance the tight-junction permeability of food allergens in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 130: 135-142.

Mizumachi K, Kurisaki J (2003). Localization of T cell epitope regions of chicken ovomucoid recognized by mice. *Bioscience, Biotechnoly and Biochemistry*. 67: 712-719.

Molina E, Chicón R, Belloque J, López-Fandiño R (2010). Alergia a proteínas lácteas en *Funcionalidad de componentes lácteos*. Recio I, Fontecha J (Eds). Limencop S.L. Alicante (España).

Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MSJ, Bottrill AR, Mills ENC (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *The FEBS journal* 272: 341-352.

Moreno FJ (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61: 50-60.

Moreno FJ, Mackie AR, Mills ENC (2005). Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9810-9816.

Moreno FJ, Quintanilla-López JE, Lebron-Aguilar R, Olano A, Sanz ML (2008). Mass spectrometric characterization of glycated beta-lactoglobulin peptides derived from galacto-oligosaccharides surviving the in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19: 927-937.

Moudgil KD, Sekiguchi D, Kim SY, Sercarz EE (1997). Immunodominance is independent of structural constraints - Each region within hen eggwhite lysozyme is potentially available upon processing of native antigen. *Journal of Immunology* 159: 2574-2579.

Mouecoucou J, Fremont S, Sanchez C, Villaume C, Mejean L (2004). In vitro allergenicity of peanut after hydrolysis in the presence of polysaccharides. *Clinical and experimental allergy* 34: 1429-1437.

Mouecoucou J, Fremont S, Villaume C, Sanchez C, Mejean L (2007). Polysaccharides reduce in vitro IgG/IgE-binding of beta-lactoglobulin after hydrolysis. *Food Chemistry* 104: 1242-1249.

Mouecoucou J, Sanchez C, Villaume C, Marrion O, Fremont S, Laurent F, Mejean L (2003). Effects of different levels of gum arabic, low methylated pectin and xylan on in vitro digestibility of beta-lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 86: 3857-3865.

Mousallem T, Burks AW (2012). Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: immunotherapy for food allergy. *Clinical and Experimental Immunology* 167: 26-31.

Nacka F, Chobert JM, Burova T, Leonil J, Haertle T (1998). Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *Journal of Protein Chemistry* 17: 495-503.

Nakamura A, Sasaki F, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H (2006). Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9529-9534.

Namiki M, Oka M, Otsuka M, Miyazawa T, Fujimoto K, Namiki K (1993). Weak chemiluminescence at an early-stage of the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1704-1709.

Nilsson L, Osmark P, Fernandez C, Bergenstahl B (2007). Competitive adsorption of proteins from total hen egg yolk during emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6746-6753.

Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry* 115: 335-345.

Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA (2011). Future therapies for food allergies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 558-575.

Nursten HE (1981). Recent developments in studies of the Maillard reaction. *Food Chemistry* 6: 263-277.

O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C (2008). Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews* 223: 114-131.

Oliver C (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 46: 337-350.

Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC, Ponsonby AL, Wake M, Tang MLK, Dharmage SC, Allen KJ, Australia HI (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 668-676.

Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, Luttkopf D, Calamari M, Ansaloni R, Scibilia J, Ballmer-Weber BK, Poulsen LK, Wutrich B, Hansen KS, Robino AM, Ortolani C, Conti A (2002). Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109: 563-570.

Patino JMR, Pilosof AMR (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids* 25: 1925-1937.

Peng HJ, Chang ZN, Tsa LC, Su SN, Shen HD, Chang CH (1998). Heat denaturation of egg-white proteins abrogates the induction of oral tolerance of specific Th2 immune responses in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 48: 491-496.

Phillips AO, Phillips GO (2011). Biofunctional behaviour and health benefits of a specific gum arabic. *Food Hydrocolloids* 25: 165-169.

Photchanachai S, Mehta A, Kitabatake N (2002). Heating of an ovalbumin solution at neutral pH and high temperature. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 1635-1640.

Polovic N, Blanusa M, Gavrovic-Jankulovic M, Atanaskovic-Markovic M, Burazer L, Jankov R, Velickovic TC (2007). A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro. *Clinical and Experimental Allergy* 37: 764-771.

Polovic ND, Pjanovic RV, Burazer LM, Velickovic SJ, Jankov RM, Velickovic TDC (2009). Acid-formed pectin gel delays major incomplete kiwi fruit allergen Act c 1

proteolysis in in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 8-14.

Rasanen L, Makinen-Kiljunen S, Harvima RJ (1998). Pectin and cashew nut allergy: cross-reacting allergens? *Allergy* 53: 626-628.

Roches AD, Nguyen M, Paradis L, Primeau MN, Singer S (2006). Tolerance to cooked egg in an egg allergic population. *Allergy* 61: 900-901.

Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE (2010). Functional regulatory T cells and allergen immunotherapy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 10: 559-566.

Romagnani S (1991). Human Th1 and Th2 Subsets - Doubt no more. *Immunology Today* 12: 256-257.

Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 638-646.

Ross MP, Ferguson M, Street D, Klontz K, Schroeder T, Luccioli S (2008). Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the national electronic injury surveillance system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121: 166-171.

Rupa P, Nakamura S, Mine Y (2007). Genetically glycosylated ovomucoid third domain can modulate Immunoglobulin E antibody production and cytokine response in BALB/c mice. *Clinical and Experimental Allergy* 37: 918-928.

Ryu SY, Roh HJ, Noh BS, Kim SY, Oh DK, Lee WJ, Yoon JR, Kim SS (2003). Effects of temperature and pH on the non-enzymatic browning reaction of tagatose-glycine model system. *Food Science and Biotechnology* 12: 675-679.

Sampson HA, Ho DG (1997). Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100: 444-451.

Sander I, Raulf-Heimsoth M, Wiemer K, Kespohl S, Bruning T, Merget R (2006). Sensitization due to gum arabic (*Acacia senegal*): The cause of occupational allergic asthma or crossreaction to carbohydrates? *International Archives of Allergy and Immunology* 141: 51-56.

Sanz ML, Corzo-Martinez M, Rastall RA, Olano A, Moreno FJ (2007). Characterization and in vitro digestibility of bovine beta-lactoglobulin glycosylated with galactooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7916-7925.

Sathe S, Teuber SS, Roux KH (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances* 23: 423-429.

Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, Moncin MSM, Retzek M, Hart C, Enrique E, Lidholm J, Cistero-Bahima A, Vieths S (2004). Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114: 900-907.

Schlamowitz M, Peterson LU (1959). Studies on the optimum pH for the action of pepsin on native and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 234: 3137-3145.

Schmidgall J, Hensel A (2002). Bioadhesive properties of polygalacturonides against colonic epithelial membranes. *International Journal of Biological Macromolecules* 30: 217-225.

Schofield AT (1908). A case of egg poisoning. *The Lancet* 1: 716-716.

Shitamori S, Kojima E, Nakamura R (1984). Studies on Ovalbumin-S-Ovalbumin Transformation .4. Changes in the Heat-Induced Gelling Properties of Ovalbumin During Its Conversion to S-Ovalbumin. *Agricultural and Biological Chemistry* 48: 1539-1544.

Sicherer SH, Noone SA, Munoz-Furlong A (2001). The impact of childhood food allergy on quality of life. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 87: 461-464.

Sicherer SH, Sampson HA (2007). Peanut allergy: Emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 491-503.

Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, Peruffo ADB, De Lazzari F, Curioni A (2001). Food allergy to wheat products: The effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5668-5673.

Sisak C, Csanadi Z, Ronay E, Szajani B (2006). Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1002-1007.

Smith MB, Back JK (1965). Studies on Ovalbumin. 2. Formation and properties of S-Ovalbumin, a more stable form of Ovalbumin. *Australian journal of Biological Sciences* 18: 365.

Smith MB (1964). Studies on Ovalbumin .1. Denaturation by Heat + Heterogeneity of Ovalbumin. *Australian Journal of Biological Sciences* 17: 261-&.

Sorensen I, Pedersen HL, Willats WGT (2009). An array of possibilities for pectin. *Carbohydrate Research* 344: 1872-1878.

Sporik R, Hill DJ, Hosking CS (2000). Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 1540-1546.

Stein PE, Leslie AG, Finch JT, Turnell WG, McLaughlin PJ, Carrell RW (1990). Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature* 347 347: 99-102.

Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT (2006). Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 6: 12-16.

Sun Y, Hayakawa S, Izumori K (2004). Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: Effect on protein structure and gel properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1293-1299.

Sun YX, Hayakawa S, Chuamanochan M, Fujimoto M, Innun A, Izumori K (2006). Antioxidant effects of Maillard reaction products obtained from ovalbumin and different D-aldoheoses. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70: 598-605.

Swintkruse L, Robertson AD (1995). Hydrogen-bonds and the pH-dependence of ovomucoid 3rd domain stability *Biochemistry* 34: 4724-4732.

Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J (2003). Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26: 969-973.

Talansier E, Loisel C, Dellavalle D, Desrumaux A, Lechevalier V, Legrand J (2009). Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties. *Lwt-Food Science and Technology* 42: 496-503.

Tanabe S (2007). Epitope peptides and immunotherapy. *Current Protein & Peptide Science* 8: 109-118.

Tatsumi E, Yoshimatsu D, Hirose M (1999). Conformational state of disulfide-reduced ovalbumin at acidic pH. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63: 1285-1290.

Taylor P (1995). Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 99: 175-185.

Teuber SS (2002) Hypothesis: The protein body effect and other aspects of food matrix effects. En *Genetically Engineered Foods Assessing Potential Allergenicity*, Fu TJGSM (ed), Vol. 964, pp 111-116.

Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, Fitzpatrick J, Mills C, Privalle L, Vieths S (2007). Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1116-1122.

Uermosi C, Beerli RR, Bauer M, Manolova V, Dietmeier K, Buser RB, Kundig TM, Saudan P, Bachmann MF (2010). Mechanisms of allergen-specific desensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126: 375-383.

Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, Komada K, Torii S, Goto M, Wakamatsu T (1997). Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100: 171-176.

Urisu A, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kawada Y, Nakajima Y, Yukawa M, Kondo Y, Tsuge I, Tokuda R, Yamada K, Kimura M (2008). Oral immunotherapy by heated and ovomucoid-reduced egg white to children with hen's egg hypersensitivity. *Allergy* 63: 412.

Urisu A, Naruse M, Ahn J, Komatsubara R, Suzuki S, Ando H, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Kobayashi S, Kimura M (2010). Office Based Oral Desensitization of Patients With Non-Anaphylactic Sensitivity to Foods Is Safe and Effective. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125: AB21-AB21.

Urisu A, Yamada K, Tokuda R, Ando H, Wada E, Kondo Y, Morita Y (1999). Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity. *International Archives of Allergy and Immunology* 120: 192-198.

Vadehra DV, Nath K (1973). Eggs as a source of protein. *CRC Critical Reviews in Food Technology* 4: 193-309.

Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 9: 1341-1346.

Verstege A, Mehl A, Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Nocon M, Beyer K, Niggemann B (2005). The predictive value of the skin prick test wheal size for the outcome of oral food challenges. *Clinical and Experimental Allergy* 35: 1220-1226.

Vickery BP, Pons L, Kulis M, Steele P, Jones SM, Burks AW (2010). Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 105: 444-450.

Vukavic T (1984). Timing of the gut closure. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 3: 700-703.

Wal J (1998). An update on allergens - Cow's milk allergens. *Allergy* 53: 1013-1022.

Wal J (2003). Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy* 58: 727-729.

Walsh BJ, Hill DJ, Macoun P, Cairns D, Howden ME (2005). Detection of four distinct groups of hen egg allergens binding IgE in the sera of children with egg allergy. *Allergologia et Immunopathologia* 33: 183-191.

Warmbier HC, Schnickels RA, Labuza TP (1976). Nonezymatic browning kinetics in an intermediate moisture model system - effect of glucose to lysine ratio. *Journal of Food Science* 41: 981-983.

Willats WGT, Knox P, Mikkelsen JD (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17: 97-104.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.

Witoonsaridsilp W, Panyarachun B, Sarisuta N, Muller-Goymann CC (2010). Influence of microenvironment and liposomal formulation on secondary structure and bilayer interaction of lysozyme. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 75: 501-509.

www.rcsb.org.

Yamasaki M, Takahashi N, Hirose M (2003). Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *Journal of Biological Chemistry* 278: 35524-35530.

Yang M, Yang CB, Nau F, Pasco M, Juneja LR, Okubo T, Mine Y (2009). Immunomodulatory Effects of Egg White Enzymatic Hydrolysates Containing Immunodominant Epitopes in a BALB/c Mouse Model of Egg Allergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2241-2248.

Yeboah FK, Alli I, Yaylayan VA (1999). Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3164-3172.

Yeboah FK, Alli I, Yaylayan VA, Yasuo K, Chowdhury SF, Purisima EO (2004). Effect of limited solid-state glycation on the conformation of lysozyme by ESI-MSMS peptide mapping and molecular modeling. *Bioconjugate Chemistry* 15: 27-34.

Young ACM, Tilton RF, Dewan JC (1994). Thermal-expansion of hen egg-white lysozyme. Comparison of the 1-center-dot-9 angstrom resolution structures of the tetragonal form of the enzyme at 100-K and 298-K. *Journal of Molecular Biology* 235: 302-317.

Zhang JW, Mine Y (1998). Characterization of IgE and IgG epitopes on ovomucoid using egg-white-allergic patients' sera. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253: 124-127.

Zubeldia JM (2001). Modelos animales de experimentación en alergología. *Alergología e Inmunología Clínica* 16: 265-266.